

# UNIVERSIDAD DE CUENCA



**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**MAESTRIA EN REPRODUCCIÓN ANIMAL.**

## **“AJUSTE DEL TIEMPO DE INSEMINACIÓN CON SEMEN SEXADO EN VACAS SUPEROVULADAS”**

*Tesis de grado previo a la  
obtención del título de Magister  
en Reproducción Animal.*

**AUTOR: MVZ. Daniel Ernesto Argudo Garzón.**

**DIRECTOR: Dr. Carlos Alonso Soria Parra. Mg.Sc.**

**CUENCA - ECUADOR  
2016**



## RESUMEN

En la actualidad los resultados de la combinación del semen sexado y superovulación (SOV) no han sido muy alentadores debido a la baja cantidad de espermatozoides así como a la corta vida media de los mismos. En un trabajo previo realizado en Brasil en vacas Holstein, se demostró que usando el protocolo de SOV P36/Lh60 e inseminando con semen sexado a las 18 y 30 horas de aplicado el inductor de la ovulación (intervalo de 12 hs entre inseminaciones) se obtiene igual cantidad de estructuras transferibles que inseminando a las 12 y 24 horas con semen no sexado. El objetivo de esta investigación fue ajustar las horas de la inseminación artificial (IA) en vacas superovuladas e inseminadas con semen sexado para lograr mejor sincronía con las ovulaciones y así aumentar la cantidad de embriones transferibles. Este ajuste evaluó 2 momentos de IA en los cuales el intervalo entre ambas se disminuyó a 6 hs. Para esto se usaron 30 vacas Holstein en producción superovuladas con el protocolo P36/LH60 y se dividieron en tres grupos en forma aleatoria; en el grupo IA18/30 (control; n=10) las inseminaciones se realizaron a las 18 horas y 30 hs de la aplicación del inductor de la ovulación (GnRh); en el grupo IA18/24 (n=10) se inseminó a las 18 y 24 hs de la GnRH y al grupo IA24/30 (n=10) se inseminó a las 24 y 30 (se usó  $2.1 \times 10^6$  espermatozoides sexados / inseminación). No se encontró diferencia estadística en los tres grupos, sin embargo el grupo IA18/24 mostró ventaja numérica sobre el grupo IA24/30 y el Control ( $4,1 \pm 1,5$  vs  $1,3 \pm 0,4$  y  $1,9 \pm 0,6$  respectivamente) en la cantidad de embriones transferibles, con lo que concluimos que el ajuste en las horas de IA con semen sexado en vacas Holstein superovuladas puede ser usado con resultados similares a los trabajos anteriores.

**PALABRAS CLAVES:** SEMEN SEXADO, SUPEROVULACIÓN, EMBRIONES, VACAS, HOLSTEIN.



## ABSTRACT

The results of the combination of sex-sorted sperm and superovulation (SOV) have not been very encouraging so far, due to the low quantity of sperms as well as their short life. In a previous study conducted in Brazil in Holstein cows, it was shown that using the protocol of SOV P36/Lh60 and inseminating with sex-sorted sperm at the 18 and 30 hours of application of the inductor of the ovulation (interval of 12 hs between the two inseminations) it is obtained an equal quantity of transferable structures than inseminating at the 12 and 24 hours with non-sorted sperm. The aim of this investigation was to adjust the hours of the artificial insemination (AI) in superovulated and inseminated cows with sex-sorted sperm to achieve better synchrony with ovulations, so in this way to increase the quantity of transferable embryos. This adjustment evaluated 2 moments of AI in which the interval diminished to 6 hs. For this, 30 superovulated lactating Holstein cows were used with the protocol P36/LH60 and were divided in three groups in an aleatory form; in the group IA18/30 (control group; n=10) the inseminations were carried out at the 18 and 30 hs of application of the inductor of the ovulation (GnRh); in the group IA18/24(n=10) was inseminated at the 18 and 24 hs of the GnRH and the group IA24/30(n=10) was inseminated at the 24 and 30 hs (it was used  $2.1 \times 10^6$  sex-sorted sperm/insemination). It was not found statistical difference in the three groups; however, the group IA18/24 showed numeric advantage over the group IA24/30 and the Control ( $4,1 \pm 1,5$  vs  $1,3 \pm 0,4$  and  $1,9 \pm 0,6$  respectively) in the quantity of transferable embryos, concluding that this adjustment in the hours of AI with sexed semen in superovulated lactating Holstein cows can be used with similar results to the previous works.

**KEYWORDS:** SEX-SORTED SEMEN, SUPEROVULATION, EMBRYOS, COWS, HOLSTEIN.



## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
TABLA DE CONTENIDO.....	4
LISTA DE FIGURAS .....	6
LISTA DE TABLAS .....	7
LISTA DE ANEXOS.....	8
CLÁUSULA DE DERECHOS DE AUTOR.....	9
CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL.....	10
AGRADECIMIENTOS .....	11
DEDICATORIA .....	12
CAPITULO I: INTRODUCCION.....	13
CAPITULO II: OBJETIVOS E HIPOTESIS.....	14
CAPITULO III: REVISION BIBLIOGRAFICA.....	15
3.1 GENERALIDADES.....	15
3.2.- TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS .....	16
3.1.1.- CRITERIOS PARA LA SELECCIÓN DE DONANTES DE EMBRIONES .	17
3.1.2.- SUPEROVULACIÓN.....	17
3.2.1.- TRATAMIENTOS SUPEROVULATORIOS.....	18
3.2.2.- SUPEROVULACION E INDUCCIÓN DE LA OVULACION PARA LA IA A TIEMPO FIJO .....	19
3.3.- RECUPERACIÓN DE EMBRIONES .....	20
3.4.- BÚSQUEDA Y EVALUACIÓN DE EMBRIONES.....	21
3.5.- SEMEN SEXADO .....	24
3.5.1.-METODOS DE SEXADO DE SEMEN.....	24
3.5.2.- DIFERENCIAS EN EL ADN LOS ESPERMATOZOIDES.....	25
3.5.3.- CITOMETRIA DE FLUJO.....	25
3.5.4.- METODOLOGÍA ACTUAL DEL SEXADO DE SEMEN BOVINO .....	26
3.5.5.- FACTORES QUE SE HAN ESTUDIADO PARA EL USO COMERCIAL DEL SEMEN SEXADO BOVINO.....	28
3.5.6.- DOSIS INSEMINANTE Y OTROS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FERTILIDAD DEL SEMEN SEXADO.....	28
3.6.- RESULTADOS OBTENIDOS DE LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES CON SEMEN SEXADO. ....	29
CAPITULO IV: METODOLOGÍA.....	31
4.1.-ANIMALES .....	31



4.2.-TRATAMIENTO DE SUPEROVULACION E INSEMINACIÓN:.....	31
4.3.- COLECTA Y EVALUCION DE EMBRIONES .....	31
4.4.- ANALISIS ESTADISTICO .....	32
CAPITULO V: RESULTADOS .....	33
5.1.- Estructuras Recuperadas .....	33
5.2.- Embriones Transferibles .....	33
5.3.- Embriones Degenerados.....	34
5.4.- Ovocitos sin Fertilizar .....	34
CAPITULO VI: DISCUSIÓN.....	36
CAPITULO VII: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	39
CONCLUSIONES.....	39
RECOMENDACIONES .....	39
BIBLIOGRAFIA.....	40
ANEXOS .....	46



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.-** Producción mundial de embriones bovinos desde 1997 a 2013 (Blondin, 2015).

**Figura 2.-** Resultados de la superovulación de cada 100 vacas (Adaptado de Donalson, 1984).

**Figura 3.-** Protocolos de SOV recomendados con IA a tiempo fijo para Vacas Bos indicus y Bos taurus de leche usando Implante de P4, E2 y P4 inyectable (Adaptado de Bó & Mapletoft, 2014).

**Figura 4.-** Circuito Cerrado con flujo continuo (Selk, 1890).

**Figura 5.- A)** Sonda Foley, **B)** Tubo en “Y” y **C)** Filtro usado para el lavado de embriones en bovinos.

**Figura 6.-** Caja Petri usada para la búsqueda de embriones.

**Figura 7.-** Esquema del desarrollo embrionario (Ramsdell, 2004).

**Figura 8.-** Diferencias entre los espermatozoides X y Y (Lawrence A Johnson, 1995).

**Figura 9.-** Fotografía de Cromosomas X y Y.

**Figura 10.-** Esquema del sexado de semen (Palma, 2008).



## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.-** Diferencias en los Cromosomas de los Espermatozoides X de Y en diferentes especies incluido el humano.

**Tabla 2.-** Resultados de Estructuras recuperadas con cada uno de los tratamientos

**Tabla 3.-** Valores Promedio y Error Estándar de Embriones Transferibles con cada tratamiento

**Tabla 4.-** Media y Error Estándar de Embriones Degenerados con cada uno de los tratamientos.

**Tabla 5.-** Resultados de Ovocitos sin Fertilizar con cada uno de los tratamientos



## **LISTA DE ANEXOS**

**ANEXO 1.-** Pruebas de normalidad de datos para estructuras recuperadas.

**ANEXO 2.-** Pruebas de Homogeneidad de las Varianzas LEVENE de las Estructuras Recuperadas.

**ANEXO 3.-** Prueba de Kruskal-Wallis de las Estructuras Recuperadas.

**ANEXO 4.-** Pruebas de normalidad de datos para Embriones transferibles, Embriones degenerados y Ovocitos sin fecundar

**ANEXO 5.-** Pruebas de Homogeneidad de las Varianzas LEVENE para Embriones transferibles, Embriones degenerados y Ovocitos sin fecundar.

**ANEXO 6.-** Prueba de Kruskal-Wallis para Estructuras recuperadas, Embriones transferibles, Embriones degenerados y Ovocitos sin fecundar.

**ANEXO 7.-** ANOVA para Estructuras recuperadas, Embriones transferibles, Embriones degenerados y Ovocitos sin fecundar.

**ANEXO 8.-** Hoja de Campo.

**ANEXO 9.-** Fotografías.

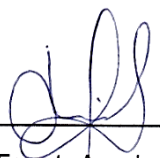




## CLÁUSULA DE DERECHOS DE AUTOR

**DANIEL ERNESTO ARGUDO GARZÓN**, autor de la tesis “**AJUSTE DEL TIEMPO DE INSEMINACIÓN CON SEMEN SEXADO EN VACAS SUPEROVULADAS**”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de **MAGISTER EN REPRODUCCIÓN ANIMAL**. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor/a

Cuenca, 12 de Julio del 2016




---

Daniel Ernesto Argudo Garzón  
C.I: 0104461165

## CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

**DANIEL ERNESTO ARGUDO GARZÓN**, autor de la tesis "**AJUSTE DEL TIEMPO DE INSEMINACIÓN CON SEMEN SEXADO EN VACAS SUPEROVULADAS**", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 12 de Julio del 2016



Firma manuscrita de Daniel Ernesto Argudo Garzón sobre una línea horizontal.

Daniel Ernesto Argudo Garzón

C.I: 0104461165



## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer de manera especial a mis padres Antonio y Teresita por brindarme el apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida y ayudarme a cumplir esta meta.

A mis hermanos Antonio y Ruth por prestarme su ayuda y atención en todo momento; a mis sobrinas Antonia y Luciana por alegrarme los días.

A todos los miembros de mi familia, cuñados, tíos y primos.

Al Dr. Carlos Soria Parra por haber sido la guía en mi formación académica y profesional.

Al Dr. Ricardo Alberio por el tiempo prestado para el desarrollo de mi trabajo y por haberme ayudado a dar los primeros pasos en el ámbito científico.

Asimismo quiero agradecer al *Grupo de Biotecnología de la Reproducción Animal* por su apoyo constante.



## **DEDICATORIA**

Quiero dedicar mi trabajo a mi Abuelita Elvia (+) por haber sido ejemplo de sencillez, lucha y perseverancia, valores que me ayudaron a culminar mis metas.

A mí querida hija Amanda por ser la principal motivación, por darle sentido a mi vida, y por ser lo que me impulsa superarme cada día.



## **CAPITULO I: INTRODUCCION**

Los terneros machos nacidos en haciendas productoras de leche generalmente resultan en pérdidas económicas ya que no producen nada y la inversión hecha para su nacimiento no se recupera.

El uso semen sexado en la transferencia de embriones constituye una herramienta con mucho potencial que repercutiría de manera positiva en la reproducción y mejoramiento genético del ganado.

En las ganaderías que optan por el uso de la transferencia de embriones como medio de multiplicación genética el uso de semen sexado sería una herramienta de gran impacto económico; sin embargo los resultados de su uso no han sido muy alentadores en los programas de transferencia de embriones ya que el número de estructuras viables obtenidas son muy variables.

Teniendo en cuenta que el semen sexado comercial tiene una concentración de  $2.1 \times 10^6$  de espermatozoides por dosis se podría pensar que el uso de varias pajuelas podrían mejorar estos resultados, pero en investigaciones realizadas el usar concentraciones de 10 y 20 millones de espermatozoides por dosis, no tuvieron diferencia significativa con el comercial. (Schenk, Suh, & Jr, 2006). En un trabajo realizado por Frijters et al., (2009) donde se usó semen sexado de 7 toros y determinaron que la disminución de las tasas de no retorno a los 56 días post servicio fue del 13,6% era influido por la combinación de la dosis bajas de espermatozoides (8.6%) y el sexado del semen propiamente (5%), también existieron diferencias significativas entre toros, lo que nos quiere decir que no todo el semen sexado comercial tiene la misma fertilidad.

Por otra parte se ha considerado en varios estudios que inseminar cerca del momento de la ovulación se tiene mejoría en los resultados ya que el hecho de sexar y congelar el semen disminuye el tiempo de vida y pre capacita a los espermatozoides por lo que estos necesitarían menos tiempo en el tracto reproductivo para tener poder fertilizar los ovocitos. (Maxwell et al., 2006; Underwood, Bathgate, Maxwell, & Evans, 2009).

Soares et al., (2011) corrobora lo dicho por Maxwell et al., (2006) cuando usó el protocolo de superovulación P36/LH60 que incluye un inductor de la ovulación 60 h después de la aplicación de la prostaglandina desarrollado por Barros y Nogueira (2001) y así realizar una inseminación en sincronía con las ovulaciones, el trabajo concluyó que las inseminaciones se deben hacer a las 18 y 30 horas de la a aplicación del inductor de la ovulación, basándonos en este último estudio planteamos ajustar el tiempo de las inseminaciones de vacas superovuladas (de 12h a 6h entre inseminaciones).



## CAPITULO II: OBJETIVOS E HIPOTESIS

### General

- Ajustar el tiempo de Inseminación Artificial (IA) con semen sexado en vacas superovuladas.

### Específico

- Determinar, dentro de la ventana establecida para realizar la IA en trabajos previos, si la misma puede ser ajustada con mayor precisión y para ello, inseminando a las vacas superovuladas con dos variantes en las horas de IA después de la aplicación de GnRh: a las 18h y 24h (IA 18/24) o a las 24h y 30h (IA 24/30) para luego comparar las estructuras obtenidas en la colecta de embriones en cantidad y calidad.

**HIPOTESIS:** Con el uso de la Inseminación IA 24/30 hay menor cantidad de ovocitos sin fecundar, menor cantidad de embriones degenerados o muertos y mayor cantidad de embriones transferibles con respecto a IA 18/24 y al Control IA 18/30.



## **CAPITULO III: REVISION BIBLIOGRAFICA**

### **3.1 GENERALIDADES**

La Biotecnología de Reproducción Animal actualmente se constituye como una valiosa herramienta tanto en la producción animal como en la comercialización de genética, y dentro de este marco la transferencia de embriones es la biotécnica reproductiva de mayor impacto ya que permite replicar animales de interés zootécnico (Orellana Banegas & Peralta Peralta, 2007) reduciendo al mínimo la posibilidad de transmisión de enfermedades.

La producción bovina enfocada a la lechería, tiene como otro de sus objetivos producir vacas de reposición para poder mantener su hato; si tomamos en cuenta que se obtiene cincuenta por ciento de machos y cincuenta por ciento de hembras nos resulta mucho más fácil y económicamente más rentable si podemos elegir el sexo de nuestras crías, cosa en la actualidad es posible con el uso de semen sexado que desde 1992 se ha venido popularizando gracias a la Citometría de flujo herramienta que logra separar espermatozoides X de los Y. (Oses, Teruel, & Cabodevila, 2009; Tubman et al., 2004).

Por otra parte la transferencia de embriones es una técnica que ha venido creciendo en los últimos años y que ha tenido gran impacto en la multiplicación de individuos de alto valor genético y por lo tanto ha permitido la aceleración en el mejoramiento de las ganaderías, en el caso específico de las lecherías y como ya se acoto anteriormente la producción de hembras de reposición es fundamental para el mantenimiento de las mismas, es por eso que el uso de semen sexado en vacas superovuladas es una propuesta muy atractiva para lograr este objetivo.

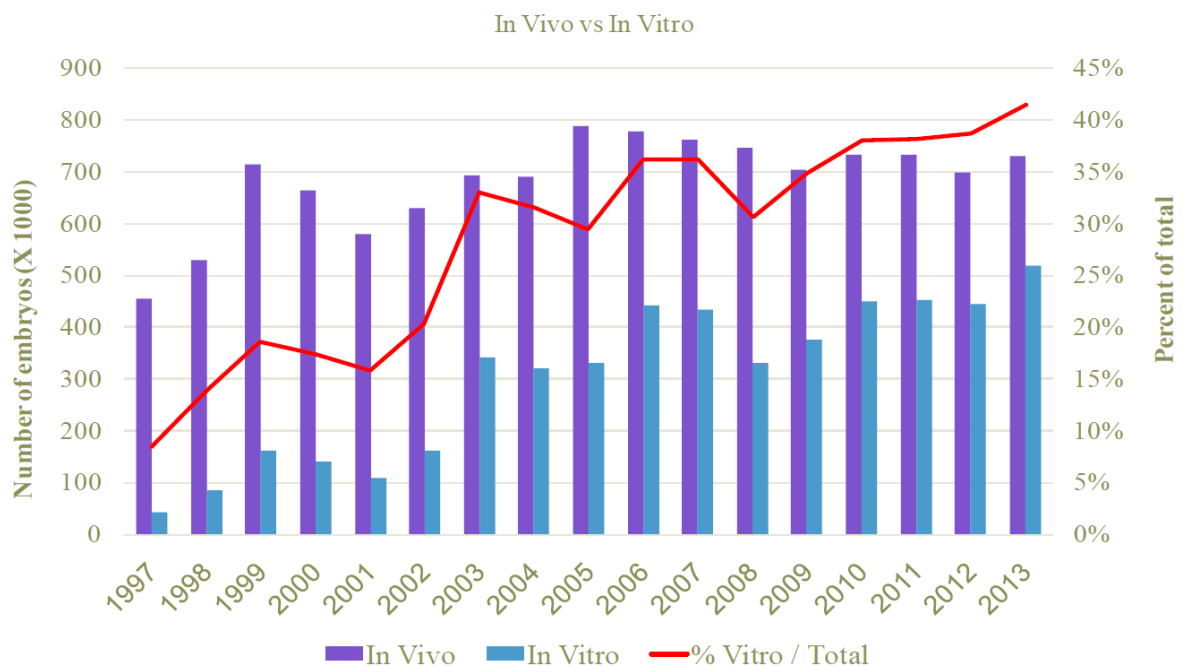
Una forma de saber el sexo de los embriones que se producen es por medio de biopsia (PCR), pero que según Hasler et al.,(2002) no es el método más óptimo ya que el 50% de los embriones serán del sexo no deseado y se desecharán, y por otra parte realizarle un biopsia a los embriones podría disminuir su viabilidad sin contar que esos embriones no podrán ser criopreservados.

Es por esto que resulta mucho más interesante producir embriones con semen sexado (DeVries et al., 2008), se han desarrollado varios trabajos sobre esta temática en donde se probaron diferentes protocolos de inseminación, variantes en el número de espermatozoides, número de pajuelas comerciales usadas, el número de inseminaciones, el lugar de depósito del espermatozoide en el útero y el tiempo de inseminación luego de detectado el celo.

A continuación se explicará por una parte todos los componentes usados en la superovulación y transferencia de embriones en bovinos, en donde se analizarán las ventajas de los diferentes protocolos, drogas, dosis y todas las variables que podrían estar afectando los resultados en la producción de embriones y después cómo se realiza el sexado del semen bovino y cómo afecta esto a las tasas de fertilización y a su vez los problemas que tiene el usar semen sexado en vacas *Bos taurus* superovuladas.

### 3.2.- TRANSFERENCIA DE EMBRIONES EN BOVINOS

En la década de los 50 se reportó la primera la transferencia de embriones (TE) en bovinos de forma quirúrgica no fue hasta los 70 y 80 en la que empezó a usar esta técnica reproductiva de manera no quirúrgica y en forma comercial (Selk, 1890), de ahí en adelante la transferencia de embriones se ha constituido como una herramienta muy importante y según reportes de la Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones (IETS) en el 2013 se produjeron alrededor de 700 mil embriones In Vivo (Fig.1) (Blondin, 2015). La TE ha servido para el mejoramiento genético, reproducir animales con problemas de fertilidad, la comercialización de genética, pruebas de fertilidad de semen, investigación científica (Leyva, Barreras, & Varizanga, 1999), control de transmisión de enfermedades y principalmente replicar animales de alto valor genético, tanto es así que se puede llegar a obtener hasta 50 crías de una vaca en un año (G. Seidel, 1981) lo que con inseminación artificial no se consigue más de 10 cría en toda la vida del animal.



**Figura 1.** Producción mundial de embriones bovinos desde 1997 a 2013 (Blondin, 2015)

La técnica actual consiste en superovular vacas donantes con el uso de gonadotrofinas, y luego de siete días de la inseminación se realiza la recolección de embriones de forma no quirúrgica. La recuperación no quirúrgica ha tenido resultados iguales que la quirúrgica en tasas de preñez con la ventaja de que no se realiza ninguna intervención que afecte la repetitividad de la técnica en la misma vaca; es decir no tienen riesgos como la anestesia general, posibles infecciones y tampoco la formación de adherencias lo que sí podría presentarse con la forma quirúrgica.





El método no quirúrgico consiste en realizar un lavado uterino y se usa una Solución Buffer Salina Fosfatada (PBS). Se realiza el lavado de cada cuerno colocando una sonda Foley, el líquido que se recupera pasa por un filtro en donde se retiene una cantidad mínima con los embriones/ovocitos que luego son buscados y aislados para posteriormente ser transferidos a una receptora o criopreservados hasta su transferencia.

### 3.1.1.- CRITERIOS PARA LA SELECCIÓN DE DONANTES DE EMBRIONES

Para que la Superovulación y transferencia de embriones (SOTE) sea exitosa es necesario que los componentes cumplan ciertos parámetros como es el caso de las Donantes de embriones ya que no todas las vacas pueden producir embriones.

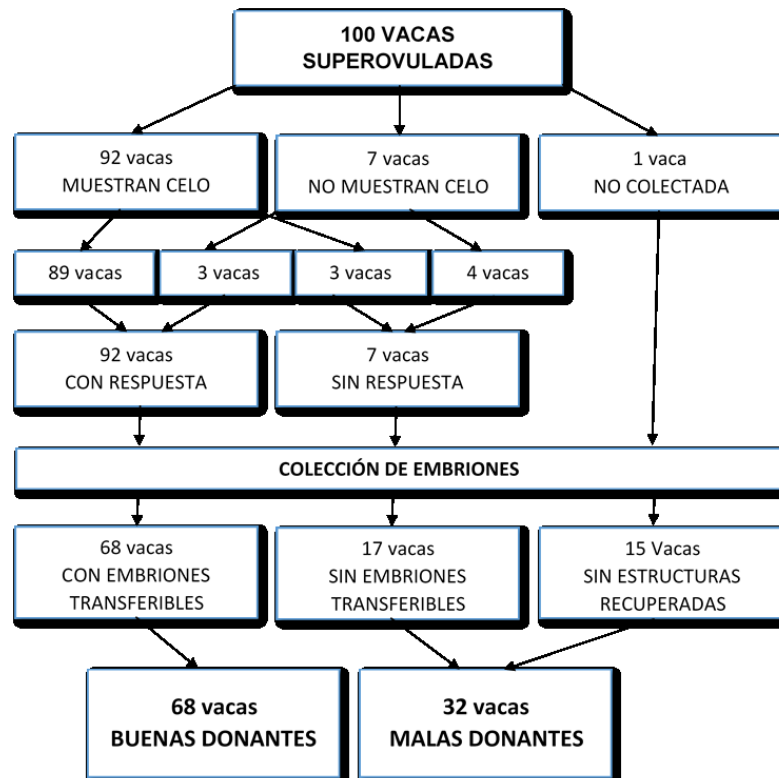
Se han planteado algunos factores que podrían ayudar a la selección de donantes de embriones que ingresan a un programa de SOTE y que ayudaría a obtener resultados satisfactorios en la recuperación de embriones (Selk, 1890), estos factores son:

- Que las donantes hayan empezado a ciclar de forma regular cuando empezaron la pubertad.
- Que en su historial no presenten más de dos servicios por concepción.
- Rendimiento superior para las características de importancia económica.
- Rendimiento productivo superior a la media.
- Sin problemas en los partos o irregularidades reproductivas.
- Sin defectos de conformación o genéticos detectables.

Existen otros factores de exclusión a tomar en cuenta como para la selección de donantes: *animales viejos, con menos de 60 días postparto, animales de baja condición corporal, vacas que presenten enfermedades, animales que tengan historial de superovulaciones fallidas o que no se hayan recuperado embriones transferibles*, entre los más importantes. (Jiménez, 2009).

### 3.1.2.- SUPEROVULACIÓN

Una vez escogida la donante el siguiente paso es realizar el tratamiento superovulatorio. Una respuesta superovulatoria efectiva es considerada cuando se producen más de dos ovulaciones (Palma, 2008). Donalson (1984) mostró que la media de producción de embriones es 4.5 embriones transferibles por colecta y que solo el 68% de la vacas superovuladas producen embriones transferibles (Fig.2).



**Figura 2.-** Resultados de la superovulación de cada 100 vacas (Adaptado de Donalson, 1984).

### 3.2.1.- TRATAMIENTOS SUPEROVULATORIOS

Las gonadotrofinas son las drogas de elección para la SOV de vacas, las que se usan son la Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) y Hormona Folículo Estimulante de origen porcino (FSH-p), cada una de ellas con sus ventajas y desventajas (R. J. Mapletoft & Bó, 2011). La eCG se administra en una sola inyección al contrario de la FSH-p que se usa generalmente en 8 aplicaciones. La eCG es una hormona de vida media larga que llega a 50h y persiste hasta por diez días en circulación (Boland, Goulding, & Roche, 1991) al contrario de la FSH-p que tiene pocas horas de vida plasmática alrededor de 5h. Actualmente la gonadotrofina de preferencia es la FSH-p ya que ha mostrado algunas ventajas sobre la eCG en la producción de embriones y sus efectos colaterales (Reuben J. Mapletoft, Bennett Steward, & Adams, 2002). Elsdén et al., (1978) demostraron que la FSH-p produce 3.8 embriones más que la eCG.

El protocolo tradicional FSH-p consiste en comenzar la superovulación (SOV) independientemente del día del ciclo en el que se encuentre con el uso de progesterona (P4) y estrógenos (E2) al inicio para eliminar la presencia de un folículo en el cuarto día se inicia la SOV con FSH-p dos veces al día por cuatro días en dosis decrecientes en un total de 400mg. Después de 48h de iniciado el tratamiento con FSH-p aplica prostaglandina (PGF2a) dos veces al día y se retira el implante de P4 la IA se hará a las 12 y 24h con la detección de celo (Bo, Adams, Pierson, & Mapletoft, 1996).

Día 0: Implante de P4+ E2

Día 4: am: FSH-p / pm: FSH-p

Día 5: am: FSH-p / pm: FSH-p

Día 6: am FSH-p+PGF2a / pm: FSH-p+PGF2a+ retiro del implante de P4

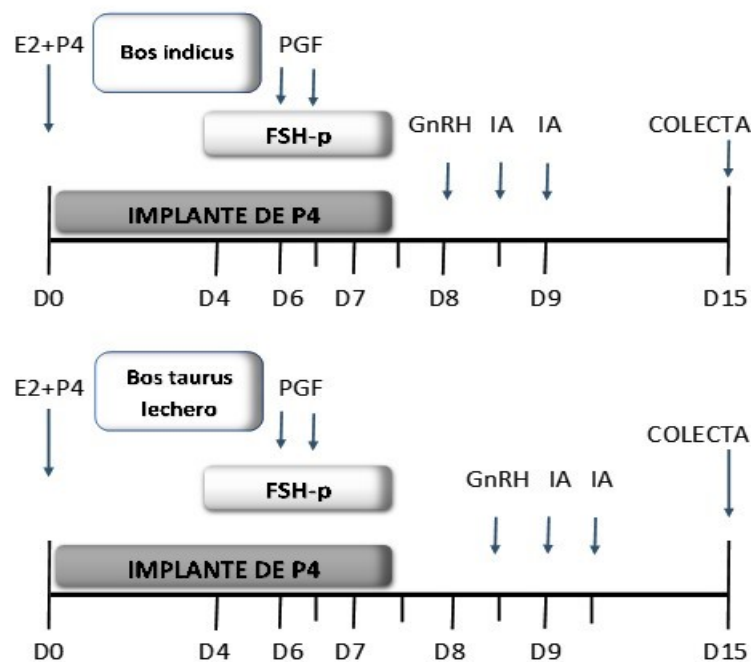
Día 7: am: FSH-p / pm: FSH-p

Día 8: am: CELO / pm: IA

Día 9: am: IA

### 3.2.2.- SUPEROVULACION E INDUCCIÓN DE LA OVULACION PARA LA IA A TIEMPO FIJO

Uno de los principales problemas en los programas de SOV es la detección de celo para la IA (R. J. Mapletoft, Bó, & Baruselli, 2009). Barros y Nogueira (2001) desarrollaron el protocolo de SOV conocido como P-36 el mismo consiste en retirar el implante de P4 36h después de la aplicación de la primera PGF2a para luego ser aplicado un inductor de la ovulación como LH de origen porcino (LH-p) o GnRH para realizar la IA a tiempo fijo. La LH en el caso de las vacas de tipo indicas es a las 48h después de la primera PGF2a y en el caso de las Taurus 60h, esto debido a las particularidades de los dos tipos de vacas con respecto al tamaño de los folículos preovulatorios (Bó, Baruselli, Chesta, & Martins, 2006). La IA se hace 12 y 24 horas después de la LH-p o GnRH y las ovulaciones ocurren entre las 24 y 36 post LH/GnRH.

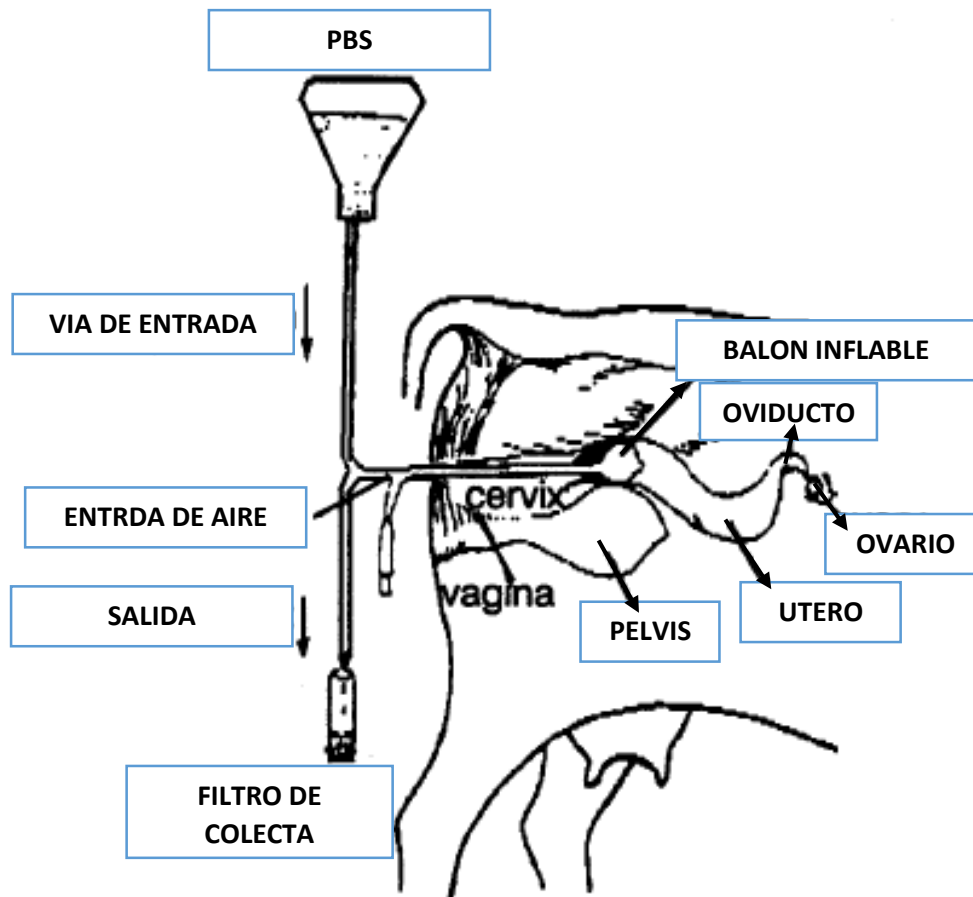


**Figura 3.-** Protocolos de SOV recomendados, con IA a tiempo fijo para Vacas Bos indicus y Bos taurus de leche usando Implante de P4, E2 y P4 inyectable (Adaptado de Bó & Mapletoft, 2014).

En síntesis para vacas *Bos taurus* de carne y *Bos indicus* se debe usar el protocolo P-36/LH o GnRH 48 y para *Bos taurus* lecheras P-36 / LH o GnRH 60.

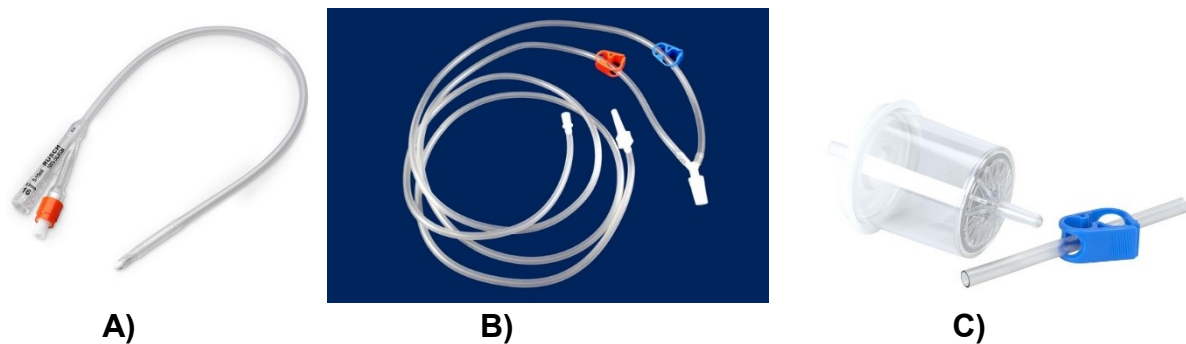
### 3.3.- RECUPERACIÓN DE EMBRIONES

Para la recuperación de embriones el método de elección actualmente es el de circuito cerrado con Flujo continuo (Fig.4) desarrollado en 1976 por Rasbech, que consiste en atravesar el cérvix con una sonda Foley de dos vías con ayuda de un Mandril o estilete y se fijarlo en el tercio medio en el cuerno, una de las vías es para inflar el balón con 8 a 12 ml de aire, la otra vía va conectada a una sonda en "Y" de silicona o látex provista de clamps que controlan la entrada y salida del medio (Fig.5). En esta sonda va conectada por el un extremo a la bolsa que contiene la solución de lavado o PBS y el otro a un filtro de malla metálica con poros entre 60 a 90  $\mu\text{m}$  donde serán retenidos los embriones en una cantidad pequeña de líquido (Callejas et al., 2008), cada cuerno es lavado con 500 ml de medio.



**Figura 4.-** Circuito Cerrado con flujo continuo (Adaptado de Selk, 1890)

Antes de empezar el lavado es necesario realizar la preparación de la donante colocándole anestesia epidural y realizando la limpieza de la zona perianal (Curtis, 2009).



**Figura 5.- A)** Sonda Foley, **B)** Tubo en “Y” y **C)** Filtro usado para el lavado de embriones en bovinos.

### 3.4.- BÚSQUEDA Y EVALUACIÓN DE EMBRIONES

El líquido que fue recuperado en el filtro es colocado en una caja Petri cuadriculada (Fig.6) de búsqueda la que se lleva a un estereoscopio de luz diascópica y se procede a la búsqueda de los ovocitos/embriones con una magnificación de 200x (Lindner & Wright, 1983). Una vez identificados se procede a aislarlos en un medio de mantenimiento para su clasificación y evaluación, se describió varias formas de clasificar a las estructuras que se recuperan de un lavado (Lindner & Wright, 1983; Wright, 1981).



**Figura 6.-** Caja Petri usada para la búsqueda de embriones

Existen dos aspectos fundamentales en los que está basada la clasificación de IETS que son *estado de desarrollo* y *calidad*.

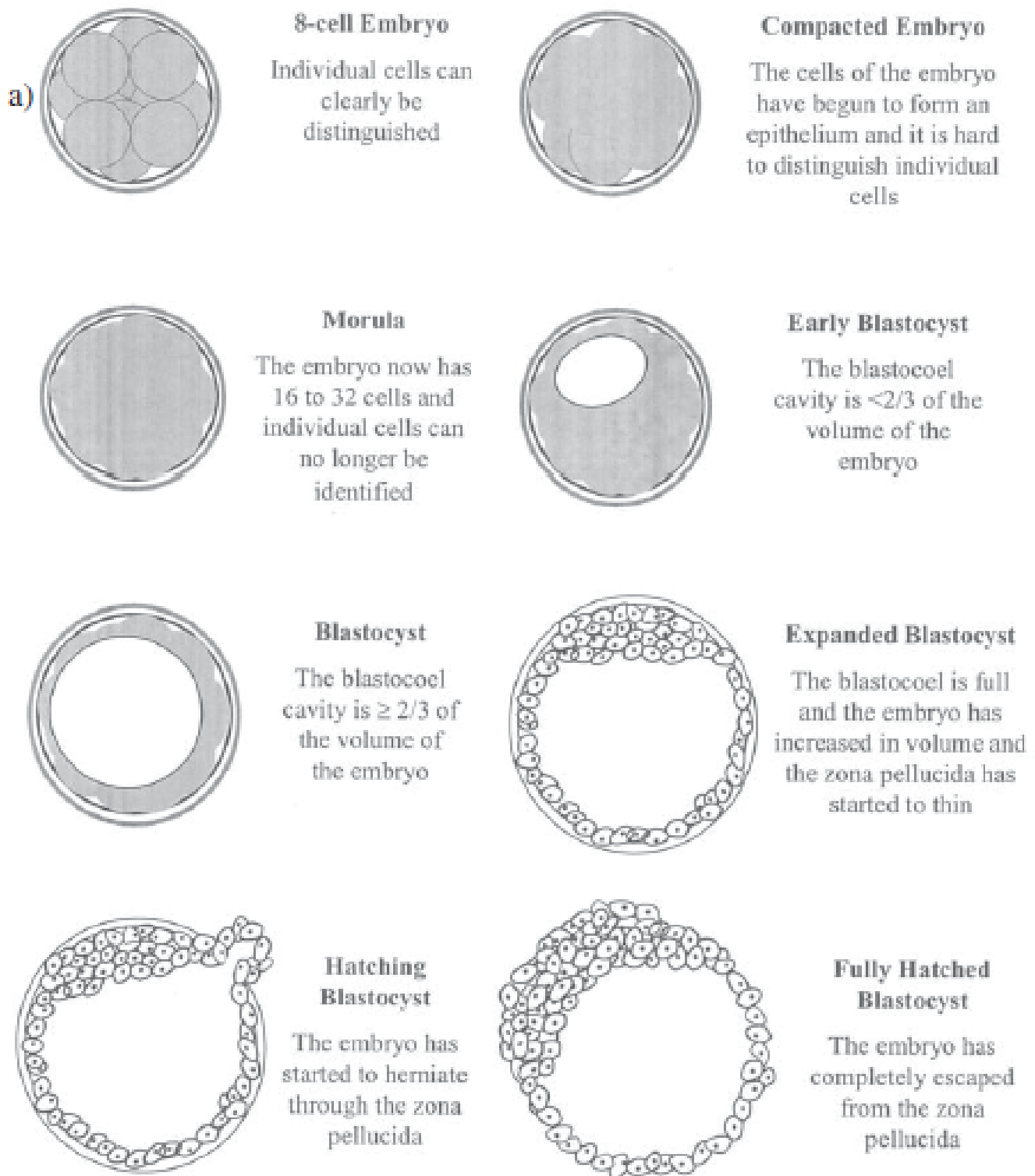
Para determinar el *Estado de Desarrollo* (Fig.7) de un embrión se toma en cuenta el tiempo desde que fue fecundado y empezó la división o clivaje y es así que se determinó de la siguiente manera:

N°	Estado de Desarrollo
1	No Fecundado
2	2 a 12 células
3	Mórula Temprana
4	Mórula
5	Blastocisto Temprano
6	Blastocisto
7	Blastocisto Expandido
8	Blastocisto Eclosionado
9	Blastocisto Eclosionado Expandido

La *Calidad* de un embrión se basa en criterios como: forma, simetría de blastómeros, apariencia, tonalidad, uniformidad de la membrana proporcionalidad entre el embrión y el espacio perivitelino, integridad de la zona pelúcida, presencia o no de detritus celulares y compactación de blastómeros entre sí (Callejas et al., 2008), todos estos fueron tomados en cuenta para realizar la siguiente clasificación por su calidad:

Código	Calidad
Código1	Excelente o Bueno
Código2	Regular
Código3	Malo
Código4	Muerto o Degenerado

Como embriones transferibles se consideran a aquellos que tienen una alta probabilidad de preñez (60 – 70%) y convertirse en un ternero, estas estructuras por su estado de desarrollo son: *Mórula Temprana*, *Mórula*, *Blastocisto temprano*, *Blastocisto* y *Blastocisto Expandido* y los de calidad *Excelente o Bueno* y *Regular* (Wright, 1981).



**Figura 7.-** Esquema del desarrollo embrionario (Ramsdell, 2004).



### 3.5.- SEMEN SEXADO

En la actualidad en la producción animal la única manera exitosa y validada para escoger el sexo de la descendencia es a través de la separación de los espermatozoides por sus cromosomas X (hembras) y Y (machos) y consiguientemente usarlos en conjunto con otras biotécnicas como son la Inseminación artificial y la Producción de Embriones (Maxwell et al., 2006).

Si consideramos que la proporción de nacimientos en todos los mamíferos es del cincuenta por ciento de hembras y cincuenta por ciento de machos y en el caso específico de los bovinos es 51% para machos y 49% para hembras (G. E. Seidel, 2009) preseleccionar el sexo de la descendencia a favor de la producción resulta muy rentable (L.A Johnson, 2000), en el caso de los bovinos si ponemos como ejemplo la producción de leche los nacimientos de los terneros machos generalmente resultan en pérdidas que los productores no recuperan, es por esto que la Citometría de flujo usado en el sexado del semen en esta área de la producción se ha desarrollado a nivel comercial con mucho éxito (Rath & Johnson, 2008) tanto es así que en EEUU se mencionan se porcentajes de concepción en inseminación artificial entre el setenta y ochenta por ciento (DeJarnette et al., 2011).

#### 3.5.1.-METODOS DE SEXADO DE SEMEN

Gracias a la ciencia y con el descubrimiento de los cromosomas se determinó la importancia de los cromosomas sexuales X-Y, a partir de aquí se ha querido separar las dos poblaciones de espermatozoides (X-Y) y para esto varias investigaciones han realizado; en un inicio los trabajos se basaron en tres aspectos como: Densidad, Carga Eléctrica y Propiedades Inmunoquímicas (Luderer, 1982) luego existieron otras investigaciones que abordaron además de los anteriores otros aspectos físicos como tamaño, peso, velocidad, etc. (Fig.8) (Garner & Seidel, 2008). También se ha tratado de modificar las condiciones en los que se encuentran los espermatozoides como el pH o la hora de Inseminación Artificial (Ballinger, 1970) e incluso usar centrifugación con gradientes de densidad y así alterar la proporción de los espermatozoides para machos o hembras, sin embargo la diferencia más importante de los espermatozoides X-Y es la cantidad de ADN ya que gracias a esta diferencia se ha desarrollado la única técnica comercialmente exitosa para la separación de los espermatozoides como es la Citometría de Flujo.

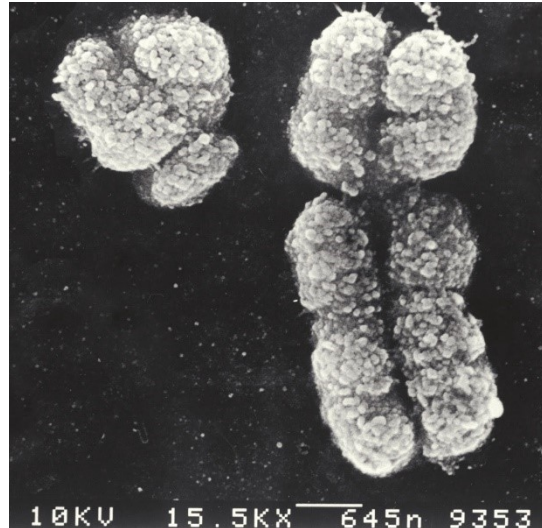
Parámetro	Diferencias X-Y	Referencia
DNA	Menos ADN en espermatozoide (espz.) "Y"	Pinkel et al. (1982); Moruzzi (1979)
Tamaño	Espz. X más largo	Cui y Matthew (1993)
Motilidad	Espz. Y más rápido	Ericsson et al. (1973)
Carga Eléctrica	X migra a cátodo	Kaneko et al. (1984)
Superficie del espz.	Antígeno H-Y presente	Hendriksen et al. (1993)(sin evidencia)
Superficie del espz.	Proteína específica	Evidencia incompleta
Cuerpo	Brazo largo del cromosoma Y	Barlow y Vosa (1970)

**Figura 8.-** Diferencias entre los espermatozoides X y Y (Lawrence A Johnson, 1995)



### 3.5.2.- DIFERENCIAS EN EL ADN LOS ESPERMATOZOIDES

Moruzzi (1979) estableció que existe diferencia en el contenido de ADN de los espermatozoides en los mamíferos y que esta diferencia podría ser usada para separar las poblaciones de espermatozoides X y Y.



**Figura 9.-** Fotografía de Cromosomas X y Y.

Dichas diferencias de ADN fueron cuantificadas en varias especies determinándose que los espermatozoides X tienen mayor cantidad de ADN que los Y en mamíferos domésticos y en el humano (Lawrence A Johnson, 1995).

**Tabla 1.-** Diferencias en los Cromosomas de los Espermatozoides X de Y en diferentes especies incluido el humano.

ESPECIE	DIFERENCIA DE ADN
Toro	3.8%
Humano	2.8%
Verraco	3.6%
Carnero	4.2%
Perro	3.9%
Conejo	3.0%
Chinchilla	7.5%

### 3.5.3.- CITOMETRIA DE FLUJO

La Citometría de Flujo es una técnica usada en diferentes campos de la salud principalmente para el conteo análisis de células y sus partes (núcleo, cromosomas y mitocondrias) (Shapiro, 2003). Ésta tecnología para el análisis de cromosomas consiste en alinear y hacer pasar las mismas una por una

teñidas con fluorocromos que son excitados con luz UV y luego un láser detecta la emisión o dispersión de luz esto es transformado en pulsos eléctricos que son cuantificados en un software de computadora (Barrera et al., 2004).

El Dr. L.A. Johnson y su colaborador Pinkel (1986) modificaron un citómetro de flujo común de tal modo que se pueda separar las dos poblaciones de espermatozoides en el bovino. La cromatina de los espermatozoides de esta especie es muy compacta debido a la morfología de su cabeza plana a diferencia de la cabeza de los espermatozoides humanos que es más ovoide y angular (Lawrence A Johnson, 1995). Por tal razón es de vital importancia la orientación del espermatozoide cuando pasen por el láser de excitación y los detectores de fluorescencia a que el ADN pueda ser analizado.

La modificación que Johnson y Pinkel realizaron tuvo como fin mejorar la orientación de los espermatozoides y que la mayor cantidad de células sea analizada para esto ellos modificaron tres partes del equipo:

- 1.- El Bisel de la punta del tubo de inyección de muestra
- 2.- Remplazo del detector de dispersión de luz por un detector de Fluorescencia
- 3.- Transferencia de la fluorescencia a un fotomultiplicador con un haz de fibras ópticas

Realizando estos cambios pudieron determinar que es posible determinar la proporción de espermatozoides X e Y de tres especies Bovino, Cerdo y Ovino.

A partir de aquí se ha ido mejorando la técnica y se pudo realizar varias investigaciones para que las poblaciones de espermatozoides separados sean viables y además puedan ser usados en los diferentes procesos biotecnológicos. Así también se determinó el fluorocromo y el diluyente a utilizar, así como la velocidad y el medio de colecta post sexado. Posterior a esto se hicieron estudios para establecer la concentración óptima para la congelación y uso en inseminación (L.A Johnson, 2000).

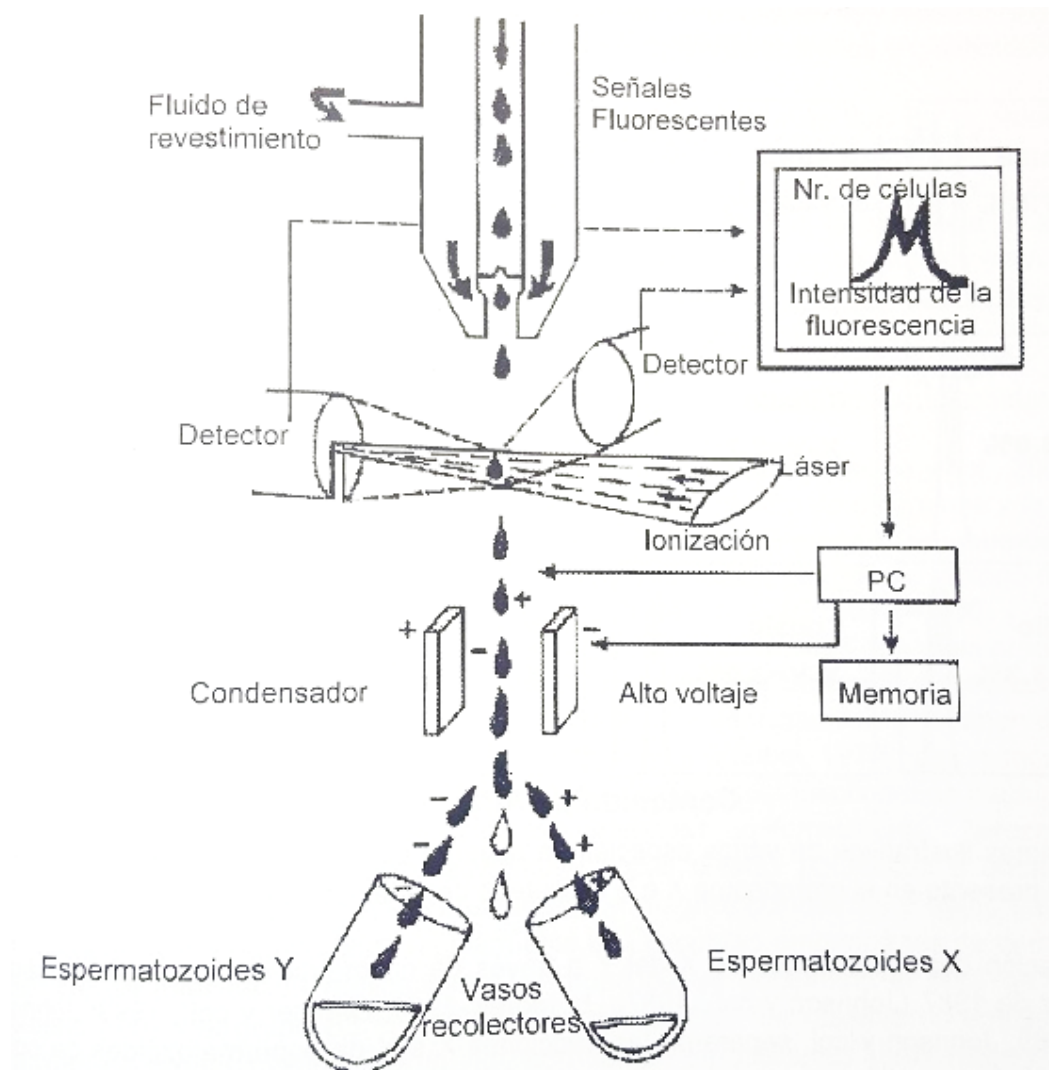
El primer reporte de nacimientos vivos exitoso luego de inseminar con semen sexado por Citometría de Flujo fue en conejos trabajo realizado por el Dr. Johnson et al., (1989).

La precisión de la separación de las dos poblaciones de espermatozoides por Citometría de flujo está determinada por las diferencias de la cantidad de ADN, en el bovino por ejemplo que tiene una diferencia del 3.8% se obtiene hasta un 95% de precisión y en la chichilla cuya diferencia es de 7.5% en el ADN es del 100%. (L.A Johnson, 2000).

#### **3.5.4.- METODOLOGÍA ACTUAL DEL SEXADO DE SEMEN BOVINO**

Los espermatozoides se ponen en contacto con Hoechst 33342 colorante vital fluorescente que tiñe el ADN y mientras más ADN contengan los cromosomas más fluorescencia emite, las células espermáticas "X" tienen más ADN que los "Y" (Fig.10). Los espermatozoides teñidos pasan uno a la vez por el citómetro de flujo

y son excitados con un láser UV y los detectores de fluorescencia colocados a  $0^\circ$  y  $90^\circ$  miden la intensidad de la misma a su vez esta es transformada en pulsos eléctricos que son contabilizados y los resultados se envían a un computador simultáneamente los espermatozoides se cargan eléctricamente, los X se cargan positivamente y los Y negativamente aquellos en los que no se identificó de que población es no se cargan de esta forma son atraídos por placas con carga opuesta a la que tienen los espermatozoides y así son separados en tubos diferentes. (Garner & Seidel, 2003; Palma, 2008)



**Figura 10.-** Esquema del sexado de semen. (Palma, 2008)

### **3.5.5.- FACTORES QUE SE HAN ESTUDIADO PARA EL USO COMERCIAL DEL SEMEN SEXADO BOVINO**

Schenk et al., (1999) publicaron una primera congelación de semen sexado bovino con porcentajes aceptables de viabilidad espermática y ahí en adelante con varias investigaciones se han determinado factores para el uso exitoso del semen sexado a nivel comercial. Dentro de dichos factores están la dosis de espermatozoides, el lugar de depósito, razas de animales, tipo de producción (leche o carne), edad reproductiva de las vacas inseminadas (Vacas o Vaconas) y efecto Toro estos entre los principales.

### **3.5.6.- DOSIS INSEMINANTE Y OTROS FACTORES QUE INFLUYEN EN LA FERTILIDAD DEL SEMEN SEXADO.**

El semen sexado tiene dos problemas a los cuales se les podría atribuir su baja fertilidad que son: el sexado propiamente dicho y su baja cantidad de espermatozoides por dosis, Frijters et al.,(2009) en su trabajo le atribuye el 5% al sexado propiamente dicho y el 8,6% a la dosis baja de espermatozoides cuando analizó y encontró una diferencia en las tasas de no retorno a los 56 días entre el semen sexado y el convencional.

El proceso del sexado semen compromete la viabilidad de los espermatozoides, estos daños han sido atribuidos a varios factores durante el proceso como son la exposición de las células espermáticas al colorante vital usado (Hoechst 33342), al láser, presión, diluciones y centrifugación para concentración espermática.

En la actualidad la concentración que es usada a nivel comercial en todo el mundo de 2.1 millones de espermatozoides por dosis esto se ha derivado de varias investigaciones. Seidel y Schenk (2008) publicaron los resultados de varias investigaciones hechas sobre las dosis inseminantes con el uso de semen sexado, en uno de sus experimentos no encontró diferencia en el porcentaje de preñez entre semen sexado con  $3 \times 10^6$  y semen convencional de  $20 \times 10^6$ .

También se determinó porcentajes de preñez de cerca del 30% de cuando se usa semen sexado y no sexado en la misma concentración de 2 millones (Bodmer et al., 2005). Con una dosis de 2.1 millones de espermatozoides por dosis se pueden conseguir preñeces hasta del 80% de lo que se consigue con semen convencional (DeJarnette, Nebel, & Marshall, 2009). DeJarnette et al.,(2010) intentaron mejorar la preñez subiendo la cantidad de espermatozoides a 3.5 millones por dosis pero no encontraron diferencia con 2.1 millones.

La capacidad actual del citómetro de flujo es de 10 pajuelas con concentración de 2.1 millones de espermatozoides sexados por hora (Garner & Seidel, 2003) y eso sumado a los resultados de concepción en campo determinó que esta fuera la dosis económicamente rentable para las empresas que producen semen de este tipo.



Existen otros factores que han sido estudiados como el lugar de depósito del semen de lo cual ha resultado que se debe depositar el semen en el cuerpo del útero ya que tratar de depositar en los cuernos no tiene ninguna ventaja y al contrario podría resultar en lesiones (G. E. Seidel & Schenk, 2008). Otro factor importante sobre la fertilidad de semen sexado y que han mostrado algunos autores que existe diferencia es el efecto toro (DeJarnette et al., 2011; Frijters et al., 2009; Sales et al., 2011) elemento que tiene que ser tomado en cuenta cuando se analiza resultados de investigaciones sobre semen sexado.

Factores relacionados directamente con las hembras como la fertilidad, edad, días abiertos, condición corporal y detección del estro son críticos y puede influenciar en las tasas de preñez (G. E. Seidel & Schenk, 2008) es por esto que de cierta forma el uso de semen sexado es preferentemente usado en vacas ya que son más fértiles.

Un elemento que podría ser determinante en la fertilidad del semen sexado considerando todo el proceso de sexado y luego congelado hacen que el tiempo de vida media sea corto por lo tanto se demostró que se mejoran las tasas de preñez cuando se insemina más cerca de la ovulación entre 0 y 12 horas antes (Sales et al., 2011), no se recomienda inseminar luego de la ovulación ya que da como resultado embriones de mala calidad y ovocitos sin fertilizar (Roelofs et al., 2006).

### **3.6.- RESULTADOS OBTENIDOS DE LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES CON SEMEN SEXADO.**

La combinación de Superovulación y transferencia de embriones (TE) utilizando semen sexado, permite diseñar estrategias cuando se comercializan animales de alto valor genético o cuando se desea conformar un núcleo genético más rápidamente. Existen diferentes trabajos donde se evaluó la utilización del semen sexado en donantes incluidas en programas de TE (Oses et al., 2009).

Cuando se usó semen de un mismo toro sexado y no sexado en vacas superovuladas experimento realizado en un estudio de Hayakawa et al., (2009) no encontraron diferencia en cuanto a los embriones transferibles y embriones degenerados pero si hubo una diferencia en los ovocitos no fertilizados en donde los obtenidos con semen sexado tuvieron mayor porcentaje (21.8% vs 5.3%).

En un trabajo similar al anterior donde se usó semen sexado y no sexado en vacas y vacas, en donde en vacas (Peippo et al., 2009) en el cual no encontraron diferencia en el número de embriones transferibles, pero en cuanto a los embriones degenerados y ovocitos sin fertilizar con el uso de semen sexado se hallaron mucho más de estas estructuras que con semen convencional, los resultados en vacas fueron totalmente diferentes en donde se obtuvo mayor cantidad de embriones transferibles con semen no sexado ( $48.4 \pm 56.0$  vs  $100.0 \pm 0$ ) y ocurrió lo mismo con los degenerados y ovocitos sin fecundar con semen sexado.



Dentro del mismo trabajo publicado por Hayakawa et al., (2009) hubo otro experimento en el que en vacas y vaconas se utilizó 1 o 2 inseminaciones y los resultados en vaconas fueron los siguientes con una sola inseminación de semen sexado a concentración de 5 millones de espermatozoides existió un porcentaje menor de estructuras transferibles que cuando se usaron dos inseminaciones, así mismo en cuanto al número de ovocitos sin fecundar fue mayor con una sola inseminación.

J.E. Larson et al., (2010) realizó un trabajo en vacas superovuladas usando cuatro pajuelas con semen sexado comercial y en otro grupo de vacas cuatro pajuelas de semen convencional en los dos casos lo realizó de la siguiente manera una pajuela cuando se detectó el celo, dos pajuelas a las 12 horas de detectado el celo y una pajuela a las 24 horas de detectado el celo en donde encontraron que con semen sexado se encontraron menos embriones transferibles y más ovocitos sin fecundar.

G.E. Seidel et al., (2008) manifiestan en cuanto al sitio de deposición del semen sexado, que el realizar inseminaciones profundas es decir depositar el espermatozoides en los cuernos no beneficia en nada con respecto a dejarlo en el cuerpo del útero, al contrario al ser dificultoso podría causar trauma; en el mismo trabajo en otro de los experimentos se encontró que inseminar con semen sexado en concentración de 2 y 6 millones no existe diferencia.

Basados en todos los trabajos anteriormente mencionados con semen sexado se obtiene menor cantidad de estructuras transferibles y al parecer el número de espermatozoides no es el único factor que afecta a la calidad de los embriones, otro elemento que es el que determina la cantidad de estructuras transferibles provenientes de vacas superovuladas e inseminadas con semen sexado es el tiempo de la inseminación luego de iniciado el celo esto lo demostraron Soares et al (2011) en un trabajo en vacas superovuladas en las que uso inseminaciones con semen convencional y con semen sexado en diferentes horas de iniciado el celo, a un grupo de vacas con semen convencional se inseminó a las 12 y 24 horas otro grupo con semen sexado a las 12 y 24, y a otro grupo con semen sexado a las 18 y 30 horas de iniciado el celo, y los resultados como se esperaba con semen convencional se encontraron mayor número de estructuras transferibles pero con semen sexado usado a las 18 y 30 horas se encontró mayor número de embriones transferibles que con semen sexado a las 12 y 24, es decir según el trabajo es mucho mejor usar el semen sexado a las 18 y 30 horas.



## CAPITULO IV: METODOLOGÍA

### 4.1.-ANIMALES

Se utilizaron 30 vacas de raza Holstein de dos haciendas ubicadas en el sector de Cumbe y Victoria del Portete. Se usó un diseño completamente al azar (DCA), los animales cumplieron las siguientes características: buen estado de salud, que tengan entre 3 a 5 años de edad con condición corporal entre 2,5 a 3, producción promedio de 12-18 litros, sin antecedentes de problemas reproductivos y que se encuentren ciclando.

### 4.2.-TRATAMIENTO DE SUPEROVULACION E INSEMINACIÓN:

Al todas las vacas se les aplicó el protocolo de superovulación P-36/LH60 descrito por Barros y Nogueira (2001) que consiste en lo siguiente:

Día0: **6 am** Implante de Progesterona (1gr) +2mg de Benzoato de Estradiol +100mg de Progesterona

Día4: **6 am** 50 mg de Fsh-p/ **6pm** 50 mg de Fsh-p

Día5: **6 am** 40 mg de Fsh-p/ **6pm** 40 mg de Fsh-p

Día6: **6 am** 30 mg de Fsh-p + 0,5 mg de Cloprostenol / **6pm** 30 mg de Fsh-p+0,5mg de Cloprostenol

Día7: **6 am** 20 mg de Fsh-p / **6pm** 20 mg de Fsh-p +Retiro de implante

Día8: **6 am** 200 µg de Acetato de Gonadorelina (GnRh)

Día 8: **pm** Inseminación Artificial: Para la IA dividimos a los animales en tres grupos de 10; cada uno recibió un tratamiento (T) con horario de inseminación diferente:

- **T1: IA18/24.- Primera inseminación:** a las 18 horas de la aplicación de GnRh y la *Segunda inseminación:* a las 24 horas de la GnRh.
- **T2: Grupo IA24/30.- Primera inseminación:** a las 24 horas de la aplicación de GnRh y la *Segunda inseminación:* a las 30 horas de la GnRh.
- **T3: Grupo IA18/30 (Control).- Primera inseminación:** a las 18 horas de la aplicación de GnRh, *Segunda inseminación:* a las 30 horas de la GnRh.

En cada IA se usó una pajuela de semen congelado sexado de 2.1 millones de concentración que provino de un solo toro.

### 4.3.- COLECTA Y EVALUCION DE EMBRIONES

Luego de 7 días de la primera inseminación se realizó la colecta de embriones por el método circuito cerrado con flujo continuo, inmediatamente se buscaron los embriones en el estereoscopio de luz diascópica, se los aisló y procedió a calificarlos según la IETS (Sociedad Internacional de Transferencia de Embriones). Se registró en la hoja de campo (Anexo 8) lo siguiente: la cantidad de estructuras recuperadas, los ovocitos sin fecundar, embriones degenerados o muertos (código 3 y 4) y embriones transferibles (código 1 y 2).



#### **4.4.- ANALISIS ESTADISTICO**

Para el análisis de los datos se utilizó un software estadístico (SPSS versión 23). A los resultados obtenidos se les aplicó pruebas de normalidad de datos y homogeneidad de varianza. Para determinar diferencias estadísticas se aplicó un Análisis de Varianza (ADEVA).

Se analizaron la cantidad de estructuras recuperadas, número de ovocitos sin fecundar, número de embriones degenerados o muertos y número de embriones transferibles.

Para presentar los resultados se usaron medias y desviación estándar con un nivel de significancia del 5% y se consideraron estadísticamente diferentes cuando  $p < 0.05$ .



## CAPITULO V: RESULTADOS

## 5.1.- Estructuras Recuperadas

Los resultados obtenidos no cumplieron los supuestos de normalidad de datos y homogeneidad de las varianzas a través de las pruebas de Shapiro-Wilk (Anexo 1) y Levene (Anexo 2) respectivamente.

Al analizar el número de las estructuras recuperadas en las diferentes horas de Inseminación Artificial (IA) en los tres tratamientos, se tomó el valor promedio de cada uno y se obtuvo un mayor número de estructuras recuperadas en el siguiente orden: T1, T3 y T2; sin embargo, al no cumplir los supuestos de Normalidad se aplicó el estadístico no paramétrico de Kruskal-Wallis (Anexo 3) y no se encontró diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $P>0,05$ ), comprobando que el número de estructuras recuperadas en los tres tratamientos mostró un comportamiento similar (Tabla 2).

**Tabla 2.- Resultados de Estructuras recuperadas con cada uno de los tratamientos**

Número de Estructuras Recuperadas		X $\pm$ EE	Intervalo Confianza 95%	
			Límite Inferior	Límite Superior
Tratamientos	T1	6,8 $\pm$ 1,7 <sup>NS</sup>	2,9	10,7
	T2	3,7 $\pm$ 0,67 <sup>NS</sup>	2,2	5,2
	T3	4,9 $\pm$ 0,69 <sup>NS</sup>	3,0	6,7

T1= IA18/24 h; T2=IA30/24 h; T3 =IA18/30 h (Control)  
X $\pm$ EE= Media  $\pm$  Error estándar de la media  
NS indican diferencia no significativa ( $p<0,05$ ), según Kruskal-Wallis

## 5.2.- Embriones Transferibles

Los resultados de esta variable cumplieron los supuestos de normalidad de datos y no de homogeneidad de las varianzas, de acuerdo a las pruebas de Shapiro-Wilk (Anexo 4) y Levene (Anexo 5), respectivamente.

Posteriormente, se analizó la cantidad de embriones transferibles tomando el valor promedio de cada tratamiento y se obtuvo un mayor número de embriones transferibles en el siguiente orden: T1, T3 y T2, sin embargo, se aplicó un ADEVA (Anexo 7) y se comprobó que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $P>0,05$ ). Por lo tanto, afirmamos que, el número de embriones transmisibles mostró un comportamiento igual entre tratamientos (Tabla 3).

**Tabla 3.-** Valores Promedio y Error Estándar de Embriones Transferibles con cada tratamiento

Número de Embriones Transferibles		X±EE	Intervalo Confianza 95%	
			Límite Inferior	Límite Superior
Tratamientos	T1	4,1±1,5 <sup>NS</sup>	0,8	7,4
	T2	1,3±0,4 <sup>NS</sup>	0,5	2,1
	T3	1,9±0,6 <sup>NS</sup>	0,6	3,1

T1= IA18/24 h; T2= IA30/24 h; T3= IA18/30 h (Control)

X±EE= Media ± Error estándar de la media

NS indican diferencia no significativa (p<0,05), según ADEVA

### 5.3.- Embriones Degenerados

Los resultados obtenidos cumplieron los supuestos de homogeneidad de las varianzas según la prueba de Levene (Anexo 5) y no cumplió la normalidad de datos con la prueba de Shapiro-Wilk (Anexo 4) se determinó la media de embriones degenerados obtenidos en el que tuvo mayor cantidad de estos el T2 seguido de T1 y T3 (Tabla 4), sin embargo al aplicar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Anexo 6) no muestran diferencia significativa (p<0,05) para ninguno de los tratamientos, demostrando que en los tres casos se produce una cantidad semejante de embriones degenerados.

**Tabla 4.-** Media y Error Estándar de Embriones Degenerados con cada uno de los tratamientos.

Número de Embriones Degenerados		X±EE	Intervalo Confianza 95%	
			Límite Inferior	Límite Superior
Tratamientos	T1	1,6±0,5 <sup>NS</sup>	0,5	2,7
	T2	1,9±0,3 <sup>NS</sup>	1,1	2,7
	T3	1,2±0,4 <sup>NS</sup>	0,3	2,1

T1= IA 18/24 h; T2=IA 30/24 h; T3 =IA 18/30 h (Control)

X±EE= Media ± Error estándar de la media

NS indican diferencia no significativa (p<0,05), según Kruskal-Wallis

### 5.4.- Ovocitos sin Fertilizar

En la Tabla 5 se muestran la media y el error estándar de los tres tratamientos; los resultados no cumplieron los supuestos de homogeneidad de las varianzas

ni tampoco de normalidad de datos según las pruebas de Levene (Anexo 5) y de Shapiro-Wilk (Anexo 4).

A pesar de que produjo más Ovocitos sin fecundar el T3 con respecto a T1 y T2 no existió diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los tratamientos cuando se aplicó el estadístico de Kruskal-Wallis (Anexo 6). Las diferentes horas de IA propuestas producen cantidad similar de Ovocitos sin fecundar.

**Tabla 5.-** Resultados de Ovocitos sin Fertilizar con cada uno de los tratamientos

Número de Ovocitos sin Fertilizar		X $\pm$ EE	Intervalo Confianza 95%	
			Límite Inferior	Límite Superior
Tratamientos	T1	1,1 $\pm$ 0,4 <sup>NS</sup>	0,2	2,0
	T2	0,5 $\pm$ 0,2 <sup>NS</sup>	0,1	0,9
	T3	1,8 $\pm$ 0,5 <sup>NS</sup>	0,6	2,9

T1= IA 18/24 h; T2=IA 30/24 h; T3 =IA 18/30 h (Control)

X $\pm$ EE= Media  $\pm$  Error estándar de la media

NS indican diferencia no significativa ( $p < 0,05$ ), según Kruskal-Wallis



## **CAPITULO VI: DISCUSIÓN**

La producción de embriones por SOV de sexo predeterminado con el uso de semen sexado en bovinos ha sido de gran impacto en especial en las ganaderías de leche ya que da la posibilidad de tener hembras de reposición en poco tiempo, sin embargo los resultados en varios estudios (Hayakawa et al., 2009; Kaimio et al., 2013; Peippo et al., 2009; Schenk et al., 2006) no han podido igualar el número embriones transferibles que se consigue con semen convencional.

En la técnica de SOV para la producción de embriones está bien descrito que las inseminaciones se deben hacer 24 y 12 h antes de la ovulación, ya que este régimen produce mayor cantidad de embriones transferibles (Roelofs et al., 2006), sin embargo existen limitantes como son la detección de celo y la variabilidad del tiempo de las ovulaciones entre individuos, es por esto que se desarrollaron protocolos de SOV en los que se incluyen inductores de la ovulación como GnRH o LH (Barros & Nogueira, 2001; Bó et al., 2006), lo que permite realizar las inseminaciones a tiempo fijo.

Por otra parte el proceso de sexado y crio conservación espermatozoides produce cambios en las estructuras de los mismos que reduce su tiempo de vida fértil en el tracto femenino y los pre capacita. Por lo mencionado anteriormente es que se debe inseminar con semen sexado en forma sincrónica con el tiempo de ovulación en la hembra, es decir la IA se tiene que realizar más cerca del momento de la ovulación para alcanzar mejores tasas de fertilización (Maxwell et al., 2006; Underwood et al., 2009).. Esto es su opinión Hay que hacerlo discusión.

Esto fue demostrado por Filho et al., (2010) que tuvo mejores porcentajes de preñez en vacas inseminadas entre las 20 y 24h del inicio del celo considerando que con semen convencional las IA se realizan a las 12h, esto fue corroborado por Sales et al., (2011) en un trabajo en vacas de carne con varios experimentos en el que sugiere realizar las IA entre 12 y 0h antes de la ovulación puede mejorar las tasas de concepción pero esto no ocurre si se hace después de la ovulación después de la ovulación.

Un único trabajo (Soares et al., 2011) ha sido realizado en superovulación tomando en consideración lo anteriormente dicho, en el que realizaron las inseminaciones de vacas Holstein superovuladas seis horas más tarde que el protocolo habitual (12 y 24hs de aplicado el inductor de la ovulación), para su estudio hizo tres grupos de animales a un grupo se le realizó las IA con semen convencional ( $20 \times 10^6$  espermatozoides / inseminación) a las 12 y 24 h de aplicado el inductor de la ovulación LH-p, al segundo grupo igual que al anterior pero con semen sexado ( $4.2 \times 10^6$  espermatozoides/ inseminación) y al tercer grupo las inseminaciones fueron realizadas a las 18 y 30 h de aplicada la LH-p con semen sexado, sin encontrar diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) entre el primer grupo y el tercero, es decir logró producir igual cantidad de embriones transferibles con semen sexado que con semen convencional.

En nuestro trabajo ajustamos el tiempo de inseminación artificial con semen sexado en vacas superovuladas, reduciendo el intervalo entre inseminaciones de 12 a 6 horas con el objetivo de tener la mayor cantidad de espermatozoides viables en el momento óptimo para la fertilización. A un grupo de vacas testigo se les realizó la IA con el régimen usado por Soares et al., 2011 es decir a las 18 y 30 h (IA18/30) de la aplicación del inductor de la ovulación (GnRH), al segundo grupo las IA se realizaron a las 18 y 24h (IA18/24) y al tercer grupo a las 24 y 30h (IA24/30).

En el grupo testigo obtuvimos  $1,9 \pm 0,6$  embriones transferibles siendo menor que lo encontrado por Soares ( $6,4 \pm 3,1$ ), en el grupo IA18/24 obtuvimos  $4,1 \pm 1,5$  embriones transferibles superando en número al grupo testigo y al grupo IA24/30 en este último se obtuvo  $1,3 \pm 0,4$ . Si bien es cierto el grupo IA18/24 tiene ventaja numérica no existió diferencia significativa con los otros dos grupos.

Resultados numéricos similares al nuestro obtuvieron Schenk et al (2006) y Peippo et al., (2009) con las IA con semen sexado a las 12 y 24h después de la detección del celo en el que recuperaron  $3,3 \pm 0,9$  y  $2,1 \pm 2,7$  embriones transferibles en vacas Angus y Holstein superovuladas respectivamente, posiblemente esta diferencia con el trabajo Soares et al., (2011) sea debido a que utilizaron el doble de espermatozoides sexados ( $4.2 \times 10^6$  / inseminación) que nosotros ( $2.1 \times 10^6$  / inseminación).

Existen varios factores podrían afectar los resultados; el proceso de sexado y la dosis baja de espermatozoides son los factores más importantes a tomar en cuenta ya que a pesar de las mejoras en la técnica no se ha logrado obtener resultados que iguallen los obtenidos con semen convencional. En SOV en los estudios citados anteriormente y en este, se han encontrado similitudes es decir alrededor de 3 embriones transferibles en promedio, lo que quiere decir y como ya es sabido el semen sexado sigue siendo menos fértil que el convencional. Esto ya fue descrito en un trabajo realizado por Frijters et al., (2009) en IA en el que le atribuye la baja fertilidad de este en un 8,6% a la dosis baja de espermatozoides que tienen el semen sexado comercial y un 5% al proceso de sexado propiamente dicho.

En superovulación no existen trabajos que muestren en que porcentaje se afecta la fertilización con cada uno de los factores (número de espermatozoides y proceso de sexaje), sin embargo con resultados de investigaciones (Schenk et al., 2006) con mayor cantidad de espermatozoides a la comercial (2.1 millones) como 10 y 20 millones no se encontró diferencias en la cantidad en la cantidad de embriones transferibles. A pesar de esto en uno de sus experimentos en el que se analiza el factor sexado de semen y se realiza una sola IA obtuvo mejores resultados para el convencional.

En la investigación también se analizó en cada uno de los tratamientos (IA18/24, IA24/30 y control) la cantidad de embriones degenerados cuyos resultados fueron  $1,6 \pm 0,5$ ;  $1,9 \pm 0,3$  y  $1,2 \pm 0,4$  respectivamente; y de ovocitos sin



fecundar fueron  $1,1 \pm 0,4$ ;  $0,5 \pm 0,2$  y  $1,8 \pm 0,5$ ; en ninguno de los dos casos existió diferencia significativa y los resultados numéricamente fueron muy similares.

Si bien, Soares et al., (2011) demostraron que las inseminaciones con semen sexado se deben hacer más tarde que con el convencional, lo obtenido en este trabajo demuestra que el tiempo de intervalo entre inseminaciones no es un factor que puede modificar la cantidad de embriones transferibles de forma considerable. Aun así la ventaja numérica conseguida en el grupo IA18/24 podría ser atribuida a que la mayor cantidad de ovulaciones se dan entre las 18 y 24 horas de aplicada la GnRH, sin embargo que no exista diferencia estadística con los otros grupos y que estadísticamente hubieron igual cantidad de embriones degenerados y ovocitos sin fecundar podría ser efecto de la variación entre las ovulaciones con respecto a la respuesta superovulatoria, es decir entre mayor sea la respuesta las ovulaciones ocurren más temprano (Bó et al., 2006).

Lo que si está bien determinado es que se deben distribuir la cantidad de espermatozoides en dos inseminaciones y no hacer una sola aunque sean inseminados mayor cantidad de espermatozoides como lo demostró Hayakawa et al.,(2009).

Resultados obtenidos en producción in vitro de embriones (Blondin, Beaulieu, Fournier, Morin, & Crawford, 2009; Xu et al., 2006) demuestran que el sexado afecta más a espermatozoides de unos toros que de otros.

Aparte de los factores mencionados sobre el semen sexado, existen otros que podrían producir bajos resultados en la producción de embriones transferibles en vacas Holstein como: la producción de leche, condición corporal, alimentación y estrés (Sartori, Bastos, & Wiltbank, 2010) dichos factores tendrían que ver con la calidad de los ovocitos.

## **CAPITULO VII: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **CONCLUSIONES**

- Aunque se obtuvo mayor cantidad de embriones transferibles en el T1 no existió diferencia estadística con el T2 y T3, es decir el ajuste realizado en el intervalo entre inseminaciones de 12h a 6h no muestran una mejoría significativa, sin embargo en el T1 (IA18/24) mostró cierta ventaja y esta variación podría ser usada con resultados aceptables en la cantidad de embriones transferibles.
- Los resultados de este trabajo nos muestran que es imprescindible que debe existir sincronía entre la hora IA con semen sexado y las ovulaciones en vacas superestimuladas y para esto se tienen que usar protocolos de superovulación con inseminaciones a tiempo fijo retrasando la inseminaciones 6 horas a lo habitual (Inseminaciones 12 y 24 horas post GnRH).
- El uso de semen sexado en la transferencia de embriones sigue siendo una propuesta muy atractiva sin embargo la variabilidad de los resultados por la baja fertilidad de los espermatozoides sexados y factores relacionados con la calidad de los ovocitos, hacen que para ser usado en programas comerciales se requiera mayor cantidad de estudios sobre la calidad de las gametas.

### **RECOMENDACIONES**

- Se recomienda el uso de semen sexado en donantes con buenos antecedentes en la respuesta superovulatoria.
- Usar semen sexado comercial de toros con fertilidad conocida en programas de Inseminación artificial o Transferencia de embriones.
- Realizar estudios similares tomando en cuenta factores como tipo, raza y producción, teniendo como precedente que en la raza Holstein no se han tenido buenos resultados. Así mismo se debería considerar la edad, es decir realizar experimentos similares en vaconas.
- También se debería probar el retraso y ajuste de la inseminación en los diferentes protocolos de superovulación, como en aquellos en los que se toma como referencia el celo natural y en los que no se usan inductores de la ovulación.
- Realizar otras investigaciones aumentando la cantidad de espermatozoides sexados por inseminación y con semen sexado con la metodología "SexedUltra™" aún en investigación (DeGraaf, Leahy, & Vishwanath, 2014; Izzo, 2015).
- Utilizar ecografías para el monitoreo del tamaño de los folículos y estimar el momento de la ovulación para realizar las IA de forma precisa.



## BIBLIOGRAFIA

- Ballinger, H. J. (1970). The effect of inseminations carried out early or late in oestrus on the sex ratio of calves born. *Veterinary Record*, 86, 631.  
Recuperado a partir de  
<https://www.cabdirect.org/?target=/cabdirect/abstract/19700103564>
- Barrera, L., Drago Serrano, M. E., Pérez Ramos, J., Sainz Espuñes, T., Zamora, A. C., Gómez Arroyo, F., & Mendoza Pérez, F. (2004). Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 17(1), 42-55.
- Barros, C. ., & Nogueira, M. F. . (2001). Embryo transfer in cattle. *Theriogenology*, 56(9), 1483-1496. [http://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00648-3](http://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00648-3)
- Blondin, P. (2015). Status of embryo production in the world, 356-358.
- Blondin, P., Beaulieu, M., Fournier, V., Morin, N., & Crawford, L. (2009). Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo, 71, 30-38. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.017>
- Bo, G. A., Adams, G. P., Pierson, R. A., & Mapletoft, R. J. (1996). Effect of progestogen plus estradiol-17 $\beta$  treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*, 45(5), 897-910. [http://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00020-9](http://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00020-9)
- Bó, G. A., Baruselli, P. S., Chesta, P. M., & Martins, C. M. (2006). The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*, 65(1), 89-101.  
<http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.10.008>
- Bó, G. A., & Mapletoft, R. J. (2014). Theriogenology Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*, 81(1), 38-48.  
<http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.020>
- Bodmer, M., Janett, F., Hässig, M., Daas, N. Den, Reichert, P., & Thun, R. (2005). Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology*, 64(7), 1647-1655. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.011>
- Boland, M. P., Goulding, D., & Roche, J. F. (1991). Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, 35(1), 5-17.
- Callejas, S., Cabodevila, J., Palma, G., Alberio, R. H., Torquati, S., Butler, H., ... Ríos, G. (2008). Evaluación de los Embriones Bovinos. En *Memorias del curso de superovulacion y transferencia de embriones bovinos*. Mar del Plata: INTA Balcarce.
- Curtis, J. L. (2009). *Procedimiento de Transferencia de Embriones en Bovinos*.
- DeGraaf, S. P., Leahy, T., & Vishwanath, R. (2014). Biological and practical





- lessons associated with the use of sexed semen. En *Rumin. Reprod. Symp* (pp. 125-140). Recuperado a partir de [http://www.dairyknowledge.in/sites/default/files/biological\\_and\\_practical\\_lessons\\_associated\\_with\\_the\\_use\\_of\\_sexed.pdf](http://www.dairyknowledge.in/sites/default/files/biological_and_practical_lessons_associated_with_the_use_of_sexed.pdf)
- DeJarnette, J. M., Leach, M. A., Nebel, R. L., Marshall, C. E., McCleary, C. R., & Moreno, J. F. (2011). Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: Is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? *Journal of Dairy Science*, 94(7), 3477-3483. <http://doi.org/10.3168/jds.2011-4214>
- DeJarnette, J. M., McCleary, C. R., Leach, M. A., Moreno, J. F., Nebel, R. L., & Marshall, C. E. (2010). Effects of 2.1 and 3.5×10<sup>6</sup> sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. *Journal of Dairy Science*, 93(9), 4079-4085. <http://doi.org/10.3168/jds.2010-3181>
- DeJarnette, J. M., Nebel, R. L., & Marshall, C. E. (2009). Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology*, 71(1), 49-58. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.042>
- DeVries, A., Overton, M., Fetrow, J., Leslie, K., Eicker, S., & Rogers, G. (2008). Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. *Dairy Science*, 91(2), 874-856.
- Donalson, L. E. (1984). Embryo production in superovulated cows: transferable embryos correlated with total embryos. *Theriogenology*, 21(4), 517-524.
- Elsden, R. P., Nelson, L. D., & Seidel, G. E. (1978). Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology*, 9(1), 17-26.
- Filho, M. F. S., Ayres, H., Ferreira, R. M., Nichi, M., & Fosado, M. (2010). Strategies to improve pregnancy per insemination using sex-sorted semen in dairy heifers detected in estrus. *THE*, 74(9), 1636-1642. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.036>
- Frijters, A. C. J., Mullaart, E., Roelofs, R. M. G., & Hoorne, R. P. Van. (2009). What affects fertility of sexed bull semen more , low sperm dosage or the sorting process ?, 71, 64-67. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.025>
- Garner, D. L., & Seidel, G. E. (2003). Past, present and future perspectives on sexing sperm. *Canadian Journal of Animal Science*, 83(3), 375-384. Recuperado a partir de <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0344962394&partnerID=tZOtx3y1>
- Garner, D. L., & Seidel, G. E. (2008). History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*, 69(7), 886-895. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.01.006>
- Hasler, J. F., Cardey, E., Stokes, J. E., & Bredbacka, P. (2002). No-nelectrophoretic PCR-sexing of bo- vine embryos in a commercial environment. *Theriogenology*, 58, 1457-1469.



- Hayakawa, H., Hirai, T., Takimoto, A., Ideta, A., & Aoyagi, Y. (2009). Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm, 71, 68-73. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.09.016>
- Izzo, M. (2015). SEX-SORTED SEMEN: THE POTENTIAL REPRODUCTIVE GAME CHANGER. En *AUSTRALIAN CATTLE VETERINARIANS & AUSTRALIAN SHEEP VETERINARIANS (ACV/ASV) ANNUAL CONFERENCE, HOBART 2015* (p. 145). Recuperado a partir de [http://acv.com.au/site/wp-content/uploads/2015/02/2015\\_Hobart\\_Proceedings\\_ebook.pdf#page=152](http://acv.com.au/site/wp-content/uploads/2015/02/2015_Hobart_Proceedings_ebook.pdf#page=152)
- Jiménez, C. (2009). Superovulación : estrategias , factores asociados y predicción de la respuesta superovulatoria en Bovinos SuperovulatiON : strategiEs , aSsociatED FACTORS , AND predicTiOn OF THE SUPEROVULATORY REPONSE IN COWS. *Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia (Universidad Nacional de Colombia)*, 56(3), 195-214. Recuperado a partir de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/remez/article/view/13769>
- Johnson, L. . (2000). Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Animal Reproduction Science*, 60-61, 93-107. [http://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00088-9](http://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00088-9)
- Johnson, L. A. (1995). Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review. *Reproduction, fertility, and development*, 7(4), 893-903. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8711222>
- Johnson, L. A., Flook, J. P., & Hawk, H. W. (1989). Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biology of Reproduction*, 41(2), 199-203.
- Johnson, L. A., & Pinkel, D. (1986). Modification of a laser-based flow cytometer for high-resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. *Cytometry*, 7(3), 268-273. <http://doi.org/10.1002/cyto.990070307>
- Kaimio, I., Mikkola, M., Lindeberg, H., Heikkinen, J., Hasler, J. F., & Taponen, J. (2013). Theriogenology Embryo production with sex-sorted semen in superovulated dairy heifers and cows. *Theriogenology*, (August), 1-5. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.025>
- Larson, J. E., Lamb, G. C., Funnell, B. J., Bird, S., Martins, A., & Rodgers, J. C. (2010). Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-sorted or conventional , frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 73(5), 698-703. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.009>
- Leyva, C., Barreras, A., & Varizanga, Mo. (1999). Aplicaciones, importancia y perspectiva de la transferencia de embriones. En L. E. Medina Gómez (Ed.), *Transferencia no quirúrgica de embriones en el ganado bovino* (pp. 15-21). Baja California, México: Universidad Autónoma de Baja California.
- Lindner, G. M., & Wright, R. W. (1983). Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20(4), 407-416. <http://doi.org/10.1016/0093->



691X(83)90201-7

- Luderer, A. A. (1982). Separation of bovine spermatozoa by density on water insoluble Newtonian gels and their use for insemination. *Biology of Reproduction*, 26(5), 813-824. <http://doi.org/10.1095/biolreprod26.5.813>
- Mapletoft, R. J., Bennett Steward, K., & Adams, G. P. (2002). Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, 42(6), 601-611. <http://doi.org/10.1051/rnd:2002046>
- Mapletoft, R. J., & Bó, G. A. (2011). The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 24(1), 278-283.
- Mapletoft, R. J., Bó, G. A., & Baruselli, P. S. (2009). Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. *Animal Reproduction*, 6(1), 114-124.
- Maxwell, W. M. C., Evans, G., Hollinshead, F. K., Bathgate, R., Graaf, S. P. De, Eriksson, B. M., ... Brien, J. K. O. (2006). Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox, 83(2004), 79-95. <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.013>
- Moruzzi, J. F. (1979). Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa. *Journal of reproduction and fertility*, 57(2), 319-23. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/513021>
- Orellana Banegas, J. C., & Peralta Peralta, E. M. (2007). Manual de procedimientos para el laboratorio de transferencia de embriones en bovinos de la empresa Genetic Resources International (GRI) and Sexing Technologies, 1-56.
- Oses, M. V., Teruel, M. T., & Cabodevila, J. A. (2009). Utilización de semen bovino sexado en inseminación artificial, transferencia embrionaria y fertilización in vitro. *Revista Veterinaria Universidad Nacional del Nordeste*, 20(2), 138-145. Recuperado a partir de <http://web.b.ebscohost.com/ehost/detail/detail?vid=9&sid=377106b9-bd86-4545-9c1d-c4d7d22048f8@sessionmgr112&hid=115&bdata=Jmxhbmc9ZXMMmc2l0ZT1laG9zdC1saXZl#AN=51153051&db=fua>
- Palma, G. A. (2008). *Biotechnología de la Reproducción*. (Reprobiotec, Ed.) (Segunda ed). Mar del Plata.
- Peippo, J., Vartia, K., Kananen-Anttila, K., Rätty, M., Korhonen, K., Hurme, T., ... Mäki-Tanila, A. (2009). Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. *Animal Reproduction Science*, 111(1), 80-92. <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.02.002>
- Ramsdell, A. F. (2004). A Laboratory Guide to the Mammalian Embryo . Edited by David K Gardner, Michelle Lane , and Andrew J Watson. Oxford and New York: Oxford University Press . \$99.50 (hardcover); \$69.50 (paper).



- xiv + 394 p + 8 pl; ill.; index. ISBN: 0–19–517151–9 (hc); 0–19. *The Quarterly Review of Biology*, 79(4), 426-426. <http://doi.org/10.1086/428185>
- Rath, D., & Johnson, L. (2008). Application and Commercialization of Flow Cytometrically Sex-Sorted Semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 338-346. <http://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01182.x>
- Roelofs, J. B., Graat, E. A. M., Mullaart, E., Soede, N. M., Voskamp-Harkema, W., & Kemp, B. (2006). Effects of insemination–ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. *Theriogenology*, 66(9), 2173-2181. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.07.005>
- Sales, J. N. S., Neves, K. A. L., Souza, A. H., Crepaldi, G. A., Sala, R. V., & Fosado, M. (2011). Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. *THE*, 76(3), 427-435. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.02.019>
- Sartori, R., Bastos, M. R., & Wiltbank, M. C. (2010). Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 22(1), 151-158. <http://doi.org/10.1071/RD09221>
- Schenk, J. L., Suh, T. K., Cran, D. G., & Seidel, G. E. (1999). Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 52(8), 1375-1391.
- Schenk, J. L., Suh, T. K., & Jr, G. E. S. (2006). Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm, 65, 299-307. <http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.04.026>
- Seidel, G. (1981). Superovulation and embryo transfer. *Science*, 211, 351-358.
- Seidel, G. E. (2009). Recomendations for using sexed bovine. En *Reunión Internacional sobre Producción de carne y Leche en climas cálidos XIX* (pp. 43-51). Baja California, México.
- Seidel, G. E., & Schenk, J. L. (2008). Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Animal Reproduction Science*, 105(1-2), 129-138. <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.11.015>
- Selk, G. (1890). Embryo Transfer in Cattle.
- Shapiro, H. M. (2003). *Practical Flow Cytometry. Practical Flow Cytometry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <http://doi.org/10.1002/0471722731>
- Soares, J. G., Martins, C. M., Carvalho, N. A. T., Nicacio, A. C., Abreu-Silva, A. L., Campos Filho, E. P., ... Baruselli, P. S. (2011). Timing of insemination using sex-sorted sperm in embryo production with Bos indicus and Bos taurus superovulated donors. *Animal Reproduction Science*, 127(3-4), 148-153. <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.08.003>
- Tubman, L. M., Brink, Z., Suh, T. K., Seidel, G. E., Tubman, L. M., Brink, Z., ... Seidel, G. E. (2004). The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at :



Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry / cell sorting 1, 1029-1036.

Underwood, S. L., Bathgate, R., Maxwell, W. M. C., & Evans, G. (2009). In vitro characteristics of frozen-thawed, sex-sorted bull sperm after refreezing or incubation at 15 or 37 °C. *Theriogenology*, 72(7), 1001-1008.

<http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.06.023>

Wright, J. M. (1981). Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interactions. *Theriogenology*, 15(1), 43-56. [http://doi.org/10.1016/S0093-691X\(81\)80017-9](http://doi.org/10.1016/S0093-691X(81)80017-9)

Xu, J., Guo, Z., Su, L., Nedambale, T., Zhang, J., Schenk, J., ... Dinnyes, A. (2006). Developmental Potential of Vitrified Holstein Cattle Embryos Fertilized In Vitro with Sex-Sorted Sperm, 2510-2518.

[http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72326-8](http://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72326-8)

## ANEXOS

### ANEXO 1.- Pruebas de normalidad de datos para estructuras recuperadas

#### Pruebas de normalidad

	Tratamientos	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
#	18/24	,330	10	,003	,843	10	,047
Estructuras	24/30	,230	10	,143	,927	10	,421
	18/30	,171	10	,200*	,953	10	,700

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

**ANEXO 2.- Pruebas de Homogeneidad de las Varianzas LEVENE de las Estructuras Recuperadas**

**Descriptivos**

# Estructuras

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
18/24	10	6,8000	5,41192	1,71140	2,9285	10,6715	1,00	19,00
24/30	10	3,7000	2,11082	,66750	2,1900	5,2100	1,00	8,00
18/30	10	4,9000	2,55821	,80898	3,0700	6,7300	1,00	10,00
Total	30	5,1333	3,76676	,68771	3,7268	6,5399	1,00	19,00

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

# Estructuras

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
3,858	2	27	,034

**ANEXO 3.-** Prueba de Kruskal-Wallis de las Estructuras Recuperadas

**Rangos**

	Tratamientos	N	Rango promedio
#	18/24	10	17,90
Estructuras	24/30	10	12,10
	18/30	10	16,50
	Total	30	

**Estadísticos de prueba<sup>a,b</sup>**

	# Estructuras
Chi-cuadrado	2,420
gl	2
Sig. asintótica	,298

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Tratamientos



**ANEXO 4.-** Pruebas de normalidad de datos para Embriones transferibles, Embriones degenerados y Ovocitos sin fecundar

**Pruebas de normalidad**

	Tratamientos	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
# Embriones Transferibles	18/24	,193	10	,200*	,855	10	,067
	24/30	,202	10	,200*	,878	10	,124
	18/30	,192	10	,200*	,872	10	,106
# Embriones Degenerados	18/24	,200	10	,200*	,883	10	,141
	24/30	,264	10	,047	,920	10	,359
	18/30	,219	10	,191	,843	10	,048
# Ovocitos sin Fertilizar	18/24	,304	10	,009	,786	10	,010
	24/30	,329	10	,003	,655	10	,000
	18/30	,251	10	,074	,882	10	,137

\*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

**ANEXO 5.-** Pruebas de Homogeneidad de las Varianzas LEVENE para Embriones transferibles, Embriones degenerados y Ovocitos sin fecundar

**Descriptivos**

		N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
# Estructuras	18/24	10	6,8000	5,41192	1,71140	2,9285	10,6715	1,00	19,00
	24/30	10	3,7000	2,11082	,66750	2,1900	5,2100	1,00	8,00
	18/30	10	4,9000	2,55821	,80898	3,0700	6,7300	1,00	10,00
	Total	30	5,1333	3,76676	,68771	3,7268	6,5399	1,00	19,00
# Embriones Transferibles	18/24	10	4,1000	4,65355	1,47158	,7710	7,4290	,00	14,00
	24/30	10	1,3000	1,15950	,36667	,4705	2,1295	,00	3,00
	18/30	10	1,9000	1,79196	,56667	,6181	3,1819	,00	6,00
	Total	30	2,4333	3,10376	,56667	1,2744	3,5923	,00	14,00
# Embriones Degenerados	18/24	10	1,6000	1,57762	,49889	,4714	2,7286	,00	5,00
	24/30	10	1,9000	1,10050	,34801	1,1127	2,6873	,00	4,00
	18/30	10	1,2000	1,31656	,41633	,2582	2,1418	,00	4,00
	Total	30	1,5667	1,33089	,24299	1,0697	2,0636	,00	5,00
# Ovocitos sin Fertilizar	18/24	10	1,1000	1,28668	,40689	,1796	2,0204	,00	3,00
	24/30	10	,5000	,52705	,16667	,1230	,8770	,00	1,00
	18/30	10	1,8000	1,61933	,51208	,6416	2,9584	,00	5,00
	Total	30	1,1333	1,30604	,23845	,6456	1,6210	,00	5,00

**Prueba de homogeneidad de varianzas**

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
# Estructuras	3,858	2	27	,034
# Embriones Transferibles	8,565	2	27	,001
# Embriones Degenerados	,809	2	27	,456
# Ovocitos sin Fertilizar	3,430	2	27	,047

**ANEXO 6.-** Prueba de Kruskal-Wallis para Estructuras recuperadas, Embriones transferibles, Embriones degenerados y Ovocitos sin fecundar

**Rangos**

	Tratamientos	N	Rango promedio
# Estructuras	18/24	10	17,90
	24/30	10	12,10
	18/30	10	16,50
	Total	30	
# Embriones Transferibles	18/24	10	17,95
	24/30	10	13,15
	18/30	10	15,40
	Total	30	
# Embriones Degenerados	18/24	10	15,30
	24/30	10	18,25
	18/30	10	12,95
	Total	30	
# Ovocitos sin Fertilizar	18/24	10	15,25
	24/30	10	11,75
	18/30	10	19,50
	Total	30	

**Estadísticos de prueba<sup>a,b</sup>**

	# Estructuras	# Embriones Transferible s	# Embriones Degenerado s	# Ovocitos sin Fertilizar
Chi- cuadrado	2,420	1,551	1,969	4,295
gl	2	2	2	2
Sig. asintótica	,298	,461	,374	,117

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Tratamientos

**ANEXO 7.- ANOVA para Estructuras recuperadas, Embriones transferibles, Embriones degenerados y Ovocitos sin fecundar**
**ANOVA**

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
# Estructuras	Entre grupos	48,867	2	24,433	1,819	,181
	Dentro de grupos	362,600	27	13,430		
	Total	411,467	29			
# Embriones Transferibles	Entre grupos	43,467	2	21,733	2,487	,102
	Dentro de grupos	235,900	27	8,737		
	Total	279,367	29			
# Embriones Degenerados	Entre grupos	2,467	2	1,233	,681	,515
	Dentro de grupos	48,900	27	1,811		
	Total	51,367	29			
# Ovocitos sin Fertilizar	Entre grupos	8,467	2	4,233	2,788	,079
	Dentro de grupos	41,000	27	1,519		
	Total	49,467	29			

**ANEXO 8.-** Hoja de campo para registro de resultados.

## HOJA DE CAMPO

## 1.- Información general

a) Fecha: \_\_\_\_\_

e) Raza: \_\_\_\_\_

b) Donante N°: \_\_\_\_\_

f) Edad: \_\_\_\_\_

c) Arete/Nombre: \_\_\_\_\_

g) Propietario(s):

d) Hacienda: \_\_\_\_\_

h) Veterinario(s):

## 2.- Superovulación:

a) Hormona: \_\_\_\_\_

b) Semen Usado: \_\_\_\_\_

c) Protocollo:

FECHA	DIA	HORA	TRATAMIENTOS

### 3.-Ecografía Previa Colecta

OVARIOS	DERECHO	IZQUIERDO
#FOLICULOS		
#CUERPOS LUTEOS		

#### 4.- Colecta de Embriones:

a) Fecha: \_\_\_\_\_

b) Hora: \_\_\_\_\_

c) # Total de Embriones Colectados: \_\_\_\_\_

### 5.- Evaluación Morfológica:

# Embrión	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Estado																									
Calidad																									

### 5.1 Codigos para Evaluacion

Estado de Desarrollo	
N°	Estado
1	No fecundado
2	2-a 12-celulas
3	Mórula Temprana
4	Mórula
5	Blastocisto Temprano
6	Blastocisto
7	Blastocisto Expandido
8	Blastocisto Eclosionado
9	Blastocisto Eclosionado Expandido

Calidad de Embriones	
<b>Codigo 1</b>	Excelente o Bueno
<b>Codigo 2</b>	Regular
<b>Codigo 3</b>	Malo
<b>Codigo 4</b>	Muerto/Degenerado



## ANEXO 9.- FOTOGRAFIAS



**Fotografía 1.-** Materiales usados para la colecta de embriones.



**Fotografía 2.-** Colecta de embriones (Tubo en “Y” y filtro tipo EmCon).



**Fotografía 3.-** Laboratorio en campo para la búsqueda y calificación de embriones.

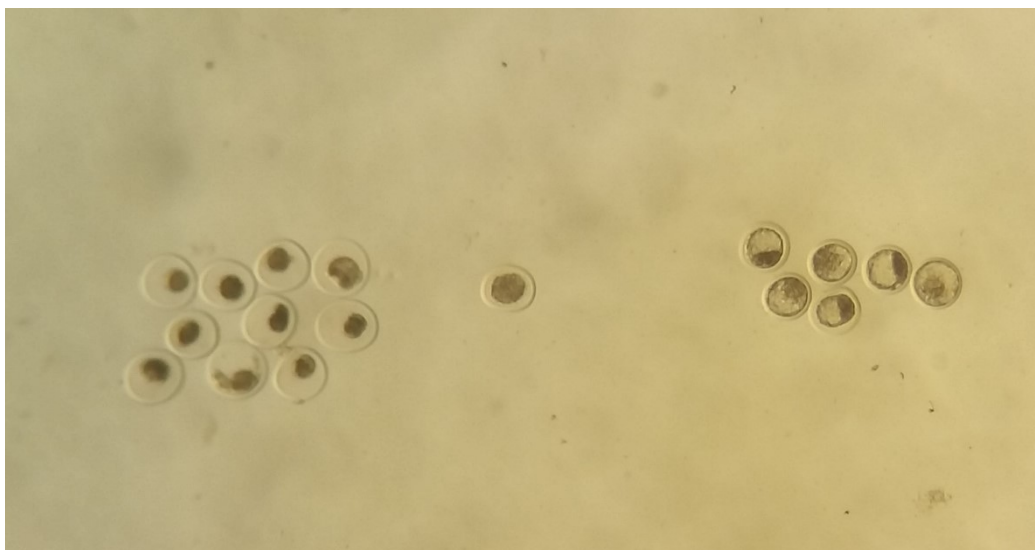


**Fotografía 4.-** Búsqueda y clasificación de embriones.

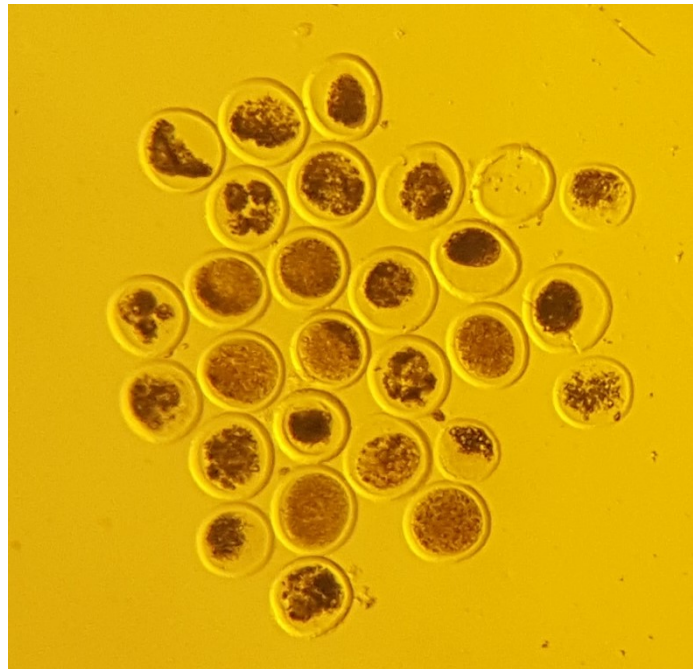




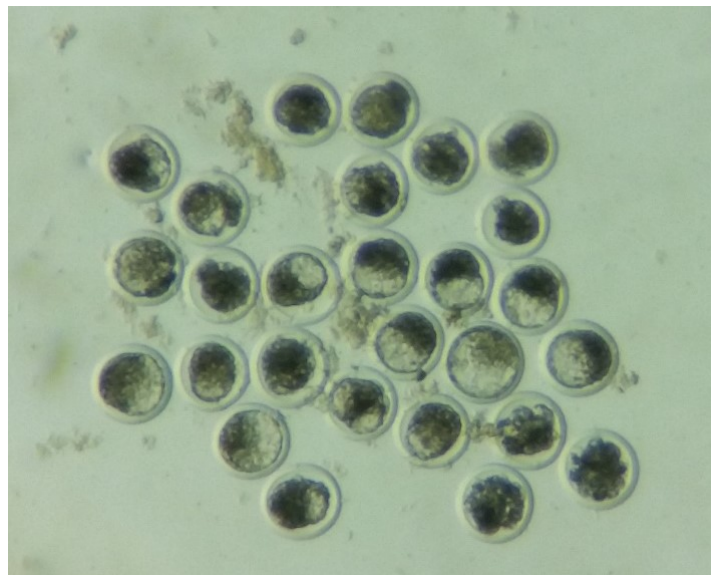
**Fotografía 5.-** Caja de Petri cuadriculada de 95mm de búsqueda.



**Fotografía 6.-** Estructuras recuperadas de un lavado considerado como “regular” (ovocitos sin fecundar, y blastocistos con código de calidad 1) con semen sexado.



**Fotografía 7.-** Estructuras recuperadas de un lavado considerado como “malo” (ovocitos sin fecundar y embriones degenerados) con semen sexado.



**Fotografía 8.-** Estructuras recuperadas de un lavado considerado como “excelente o bueno” (mórulas y blastocistos con código 1 y 2) con semen sexado.